

La Vitamine antiscorbutique

(VITAMINE C)

Etude chimique et biologique

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 18 juin 1935

à la Faculté de Pharmacie de Nancy

POUR OBTENIR

le titre de Docteur de l'Université de Nancy

(Mention Pharmacie)

PAR

Jean JOURDEL

né à Mont-Saint-Quentin (Somme), le 31 janvier 1912

Président. . . MM. PASTUREAU.

Examineurs. . } MEUNIER.
DONZELOT.

NANCY

IMPRIMERIE GEORGES THOMAS

28, Rue de Solignac

1935



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547406_0035

La Vitamine antiscorbutique

(VITAMINE C)

Etude chimique et biologique

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le juin 1935

à la Faculté de Pharmacie de Nancy

POUR OBTENIR

le titre de Docteur de l'Université de Nancy

(Mention Pharmacie)

PAR

Jean JOURDEL

né à Mont-Saint-Quentin (Somme), le 31 janvier 1912

Président. . . . MM. PASTUREAU.

Examineurs. . } MEUNIER.
DONZELOT.

NANCY

IMPRIMERIE GEORGES THOMAS

28, Rue de Solignac

1935

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE

M. BRUNTZ, O , , I , O , , , recteur de l'Université de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. GRÉLOT, , I , 

BRUNTZ, O , , I , O , , 

DOYEN

M. GILLOT, I , 

ASSESEUR

N...

PROFESSEURS :

MM.

DOURIS, I  ,  , 	Toxicologie.
PASTUREAU, O  , I 	Pharmacie chimique.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Histoire naturelle.
LASSEUR,  , I  , 	Microbiologie
GILLOT, I  , 	Matière médicale.
PRÉVOST, 	Chimie organique.
N...	Pharmacie galénique.

AGRÉGÉ LIBRE

M. GIRARDET, , I  Chimie et Toxicologie. |

CHARGÉ DE COURS MAGISTRAL

M. MEUNIER Pharmacie galénique.

CHARGÉS DE COURS :

MM.

VERNIER, I 	Zoologie.
CORDEBARD,  , I 	Analyse chimique.
DONZELOT	Physique.

CHEFS DE TRAVAUX :

MM.

VERNIER, I 	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD,  , I 	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ	Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux).....	Physique.
RICHARD (chargé de travaux).....	Pharmacie.
COLLET (chargé de travaux).....	Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT

M. TRIBOLET, I  Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les approuver.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA FAMILLE

A mon Président de Thèse

M. LE PROFESSEUR PASTUREAU

Professeur de Pharmacie chimique

A mes Juges:

M. MEUNIER

Chargé de cours de Pharmacie galénique

M. DONZELOT

Chargé de cours de Physique

En hommage de ma respectueuse gratitude.

INTRODUCTION

Peut-être n'est-il pas sans intérêt de noter, au seuil de notre thèse, que la science de la nutrition, qui joue aujourd'hui un rôle si considérable dans l'œuvre prophylactique des Nations civilisées, ne remonte guère à plus d'un siècle. Ce n'est, en effet, qu'en 1836, avec la création à Pechelbronn, sur l'initiative de BOUSSINGAULT, de la première station française de recherches agronomiques, que le problème de l'hygiène alimentaire commença vraiment à s'imposer à l'attention des savants.

Le retard dont souffrirent les études relatives à la nutrition s'explique, d'ailleurs, par le fait qu'elles exigent de sérieuses connaissances en anatomie, en chimie, en physique et en physiologie, sciences qui ne se sont sensiblement développées qu'à la fin du XVIII^e siècle. De plus, il y a lieu de remarquer que les recherches, quant aux substances indispensables furent toujours plus faciles chez les végétaux que chez les animaux. Ce n'est qu'à partir de 1850 environ que, grâce aux progrès réalisés dans l'analyse chimique, on parvint assez rapidement à reconnaître les principes immédiats indispensables à la vie de l'animal. On commença, dès cette époque, à préparer des régimes bien

constitués, c'est-à-dire renfermant, en proportions convenables, toutes les substances connues.

C'est PASTEUR, en définitive, avec ses célèbres travaux sur les fermentations, qui assura à l'étude du problème un terrain solide et riche en possibilités. Sans doute, dès 1835, CAGNIARD DE LA TOUR et SCHWANN, confirmant en cela la théorie avancée par le naturaliste hollandais LEEUWENHOECK un siècle et demi auparavant, avaient discerné l'étroit rapport entre la fermentation et le développement de l'être vivant. Mais leur explication avait été violemment combattue, particulièrement par LIEBIG, et il ne fallut rien de moins que les expériences de PASTEUR pour réduire au silence les contempteurs.

PASTEUR montra que la levure était capable de se développer en un milieu synthétique et nota, d'autre part, que la fermentation était plus active lorsqu'on additionnait ce milieu de culture de jus de raisin, ou de jus de betterave, ou de sérum sanguin ou, mieux encore de la partie soluble de la levure.

Pour ce qui est des animaux supérieurs, on ne put réussir, avec des substances simples, purifiées, de composition chimique aussi définie que possible, à réaliser des régimes alimentaires. De nombreuses expériences furent, en vain, tentées dans ce domaine. Enfin, en 1912, HOPKINS put conserver en bon état de santé, et même permettre le développement, de rats soumis à un régime artificiel augmenté d'une certaine quantité de lait, alors que les animaux privés de cet aliment mouraient. Et ce résultat, comme de juste, fit penser à HOPKINS que le lait devait contenir les fac-

teurs indispensables à l'entretien de la vie, autrement dit des vitamines.

Ces facteurs identifiés depuis lors, furent classés, selon leurs propriétés particulières, en facteurs ou vitamines hydrosolubles et liposolubles.

Le groupe des vitamines hydrosolubles se décompose comme suit :

- 1° La vitamine antiscorbutique (C).
- 2° La vitamine antinévritique (B¹).
- 3° La vitamine d'utilisation nutritive (B²).
- 4° La vitamine d'utilisation cellulaire (B³).
- 5° La vitamine antipellagreuse (P).

Le groupe des vitamines lipo-solubles (nommées vitastérines par FUNK) comprend les vitamines suivantes :

- 1° La vitamine de croissance proprement dite ou antixérophtalmique (A).
- 2° La vitamine antirachitique (D).
- 3° La vitamine de la reproduction (E).

Parmi ces facteurs, le facteur antiscorbutique allait donc être étudié grâce à l'emploi de régimes spécifiques. En 1918, on l'appela la vitamine C et on le classa dans le groupe des vitamines hydrosolubles.

*
* *

Sur le conseil de M. le professeur PASTUREAU, que nous prions de trouver ici nos remerciements bien sincères, nous avons tenté d'établir une sorte de bilan

des travaux se rapportant au scorbut et de dégager, dans la mesure de nos connaissances, la présente vérité quant à la place qu'occupe la vitamine C dans la science de la nutrition.

Après avoir passé rapidement en revue les nombreuses et très diverses hypothèses avancées par les savants, au cours des siècles, concernant le phénomène scorbutique, nous nous sommes efforcés de mettre en lumière les précieuses recherches contemporaines concernant l'acide ascorbique et plus spécialement les travaux comme ceux de BEZSSONOFF, qui apportèrent une si vigoureuse impulsion à l'étude de la vitamine C; de TILLMANS sur le titrage chimique; de BIRCH, HARRIS et RAY sur les déterminations et, surtout, après avoir salué en passant l'effort de HAWORTH, du Hongrois SZENT GYÖRGYI qui, véritable découvreur de la vitamine C, a fait faire un si grand pas à la question qui nous occupe.

Dans l'élaboration de notre travail, il nous fut donné de consulter un nombre important d'ouvrages, qu'il serait assez fastidieux d'énumérer ici, mais que nous avons pensé utile de grouper en un tableau bibliographique. Parmi ces références, que l'on nous permette pourtant de dire que nous sommes tout particulièrement tributaires des collections du *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, du *Biochemical Journal* et du *Journal of Biological Chemistry*. L'excellent livre de M^{me} Lucie RANDOIN sur les vitamines et la thèse de M^{lle} A. MICHAUX sur le cobaye normal et le cobaye soumis à un régime scorbutigène, nous furent également précieux.

Nous avons tenté, en confrontant les diverses hypothèses, en précisant les tâtonnements et les erreurs, en faisant ressortir les expériences victorieuses et les résultats acquis d'établir, d'une manière aussi satisfaisante que possible, un état susceptible de faciliter dans ce domaine la tâche qui peut s'imposer à certains.

Avant d'aborder notre thèse, devons-nous nous demander si la vitamine C représente le dernier mot de la question que nous étudions ici? Si oui, nous devons avouer que les incessants progrès de la Science ne nous permettent pas une semblable affirmation. Mais ce que l'on peut ajouter, sans hésitation aucune, c'est que cette découverte marque une date honorable dans les annales de l'hygiène alimentaire et autorise tous les espoirs.

PLAN

Pour la clarté de notre travail, nous avons cru devoir adopter les grandes divisions suivantes :

PREMIÈRE PARTIE

Le Scorbut

DEUXIÈME PARTIE

Autour du problème de la Vitamine C

TROISIÈME PARTIE

Caractérisation de la Vitamine C (acide ascorbique)

QUATRIÈME PARTIE

Le Dosage de la Vitamine C

CINQUIÈME PARTIE

La Vitamine C chez les êtres vivants

SIXIÈME PARTIE

Action Biologique de l'acide ascorbique

PREMIÈRE PARTIE

LE SCORBUT

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

D'après les écrits des anciens, le scorbut était déjà une maladie bien connue par ses effets à des époques assez reculées. Il semble, en effet, que la dyscrasie hémorragique, comme l'appelaient autrefois de nombreux auteurs, est apparue dès le début de la civilisation. Vraisemblablement, il n'a pas dû atteindre l'homme primitif. Son éclosion a été le résultat des transformations que, par suite de la nécessité, les individus ont fait subir aux aliments, soit pour les conserver, soit pour en retirer les parties les plus nutritives ou les plus agréables. Du fait de cette sélection, il s'ensuivit une trop grande uniformité dans les régimes avec, pour conséquence, l'élimination ou la destruction de portions d'aliments contenant des principes indispensables.

Le scorbut a été observé dès l'antiquité grecque et romaine. HIPPOCRATE en parle déjà, et le caractérise par l'apparition chez les sujets atteints de fréquentes hémorragies et de l'ulcération des gencives. PLINE désigne sous le nom de *stomacace* une maladie qui semble être le scorbut; elle frappa, au dire de cet au-

teur, l'armée de GERMANICUS approchant du Rhin. Au XIII^e siècle, l'armée de SAINT-LOUIS en fut atteinte en Egypte, lors de la huitième croisade. Le sire de JOINVILLE nous en dépeint les caractères terrifiants, constatés sur de nombreux individus au moment du siège du Caire, en 1249. JOINVILLE écrit :

« Et nous vint la maladie de l'ost, qui étoit telle, que la chair de nos jambes séchoit et étoit tardée de noir et de terre; et à nous qui avions maladie telle, venoit chair pourrie aux gencives et nul n'échappoit. Le signe de la mort étoit que là où le nez saignoit, il fallait mourir. »

Puis, durant trois siècles, un certain nombre d'historiens et de voyageurs y font çà et là quelque allusion. Le mot scorbut viendrait du hollandais *scheurbiwick*, vieille appellation issue elle-même du danois *skjærbug*. Au XVI^e siècle, on s'intéressa à l'étude des caractères de cette maladie, et de nombreuses publications s'évertuèrent à en énumérer les causes et à indiquer l'essentiel de son traitement. L'histoire nous apprend que les soldats de Charles QUINT en furent atteints. Deux siècles plus tard, en 1737, ce fut le fait des Prussiens de la garnison de Thorn, et en 1760, des Français à Québec. Enfin, pendant la guerre de Crimée (1854-1856), la guerre de 1870, la guerre des Boers, et plus récemment la guerre mondiale, de nombreux cas ne cessèrent d'être notés.

CHAPITRE II

L'ÉTUDE DU SCORBUT

a) CHEZ L'ADULTE

Sans entrer dans les détails, nous allons donner les principaux symptômes qui caractérisent les diverses phases de l'évolution de la maladie. La première phase, ou période du début, se révèle par les traits suivants: le malade est triste, blême, las; il éprouve des douleurs aux jambes. Ses gencives gonflent, saignent au moindre contact. La peau des jambes et des cuisses, sèche et luisante, se couvre de taches bleuâtres. Les articulations des membres et les articulations costo-sternales deviennent douloureuses.

La seconde phase, appelée scorbut confirmé ou période d'état, est caractérisée par l'ulcération de plus en plus profonde des gencives, par le déchaussement des dents, et la fétidité insupportable de l'haleine. L'apparition des ecchymoses décèle des hémorragies intra-musculaires et sous-cutanées. Les jambes deviennent raides, et les genoux s'enflent douloureusement. Il se produit un piqueté hémorragique qui se développe sur tout le corps. Les taches bleuâtres

s'étendent à la poitrine et aux bras. Les gencives saignent et des hémorragies se produisent par le nez. Une diarrhée persistante achève de déprimer le malade, qui pourtant conserve un assez bon appétit. L'urine, peu abondante, est quelquefois albumineuse.

La troisième phase, ou période de terminaison, qui apparaît au bout de deux à trois mois après le début de la maladie, vient compléter d'un cortège terrifiant les désordres déjà graves de la deuxième période. L'ulcération des jambes s'accroît lorsque les ecchymoses reçoivent le moindre choc. Les dents tombent, les lésions des gencives augmentent, les maxillaires se nécrosent. Les os sont très fragiles; il se produit un décollement des épiphyses des os longs. Les hémorragies se généralisent: gastrorrhagies, hémorragies de l'intestin, et même bronchorragies. Les urines et les selles sont sanguinolentes. Le moribond éprouve un sentiment très net d'oppression; sa respiration devient précipitée et laborieuse.

Souvent il n'atteint pas cet ultime degré et meurt par défaillance cardiaque à la fin du second stade.

Le scorbut frappe les individus astreints à une nourriture trop uniforme ou trop raffinée, de même que les collectivités à l'approvisionnement défectueux, et livrées de ce fait au régime des produits conservés.

Parmi ses victimes, on compte des marins, des explorateurs, des soldats des armées en campagne et des habitants de villes assiégées.

Les causes étaient attribuées, autrefois, à l'influence prolongée de l'atmosphère maritime, au froid, à l'humidité, aux brusques écarts de température, à

la mauvaise qualité de la nourriture, aux eaux polluées, à l'absence de boissons fermentées et d'aliments frais; enfin, aux états psychiques de l'individu (tristesse, etc...).

Les remèdes que l'on préconisait, en plus des prescriptions fondées sur les raisons de la maladie, étaient l'emploi des aliments frais, des cordiaux acidulés, des boissons fermentées, des amers stomachiques et des substances dites antiscorbutiques (esprit de corne de cerf, esprit ardent de cochléaria, infusion de serpentaire de Virginie, etc...). On savait que la possibilité de guérir un individu dépendait de l'évolution de la maladie; que les sujets guéris restaient prédisposés et que, presque toujours ils conservaient des séquelles. Le mal se manifestait sous forme de rhumatismes chroniques, de douleurs, de raideurs dans les articulations et leur laissait un signe caractéristique: l'état anormal des gencives.

Recherche de la cause essentielle du scorbut

La cause réelle du scorbut passa inaperçue pendant longtemps, ce qui porta à une interprétation erronée de son caractère de propagation. Les raisons de son allure épidémique n'avaient pas été élucidées. C'est seulement en 1671, qu'un Français, Nicolas VENETTE, affirma qu'il existait une relation entre l'apparition du scorbut et l'absence de végétaux frais dans l'alimentation; en 1720, le Hongrois KRAMER, puis en 1734 le Suédois BACHSTROM, firent les mêmes observations. BACHSTROM nous dit:

« Partout où les individus, par négligence ou nécessité, ne peuvent consommer de fruits ou de légumes verts, l'affection ne tarde pas à apparaître, quels que soient le sol, le climat ou l'âge des individus. »

En France, LE ROY de Méricourt, médecin de la marine, soutint cette même thèse en 1874. Mais c'est à l'Angleterre que nous devons d'avoir donné le bon exemple, dès 1757, en prescrivant aux navires de l'Etat l'emploi de fruits frais. Actuellement les cas de scorbut, très peu fréquents d'ailleurs, n'apparaissent que dans des circonstances spéciales, là où l'approvisionnement de certaines collectivités est encore difficile; les derniers exemples datent de la guerre 1914-18: ils furent relevés parmi les troupes serbes et les troupes italiennes de Macédoine.

b) CHEZ L'ENFANT

On observe aussi chez l'enfant des symptômes de scorbut, à peu près identiques à ceux de l'adulte, La maladie se déclare généralement entre le sixième et le dix-huitième mois. Un médecin allemand, MOELLER, en donna, en 1856, une description exacte. L'apparence des lésions osseuses l'inclina à penser qu'elles étaient dues à un rachitisme aigu. THOMAS BARLOW, en 1894, en décela la véritable origine et en fit une étude complète.

Symptômes du scorbut infantile ou maladie de Barlow

Ce que l'on observe tout d'abord chez le petit malade, c'est qu'il est pâle, grognon, et qu'il dort mal.

Les membres inférieurs sont douloureux, les articulations se gonflent. Des lésions hémorragiques plus ou moins intenses apparaissent : pétéchies, ecchymoses et, si l'enfant a des dents, la gingivo-stomatite se caractérise. L'état est fébrile, les troubles digestifs avec vomissements et perte d'appétit précèdent une dernière phase où la maladie évolue rapidement ; les hémorragies deviennent fréquentes (hémorragie intra-musculaire, intestinale). A l'autopsie, on observe des lésions osseuses plus accentuées aux épiphyses ; parfois l'os est aminci à un tel point qu'il se produit une rupture.

La cause du scorbut infantile

Le scorbut infantile est dû à la stérilisation des laits et à la fabrication par les industriels de compositions à base de farines de céréales et de mélanges purifiés faciles à employer sous forme de bouillie, et que l'on emploie trop exclusivement après le sevrage.

Etats présorbutiques

Les symptômes de l'état presorbutiques se révèlent par une sensation de malaise, de faiblesse générale, de grande fatigue. Le malade éprouve de légères douleurs aux membres inférieurs ; ses gencives saignent et souvent des troubles intestinaux se produisent. Cet état se manifeste généralement parmi les habitants des villes où l'hygiène alimentaire est insuffisante. La préparation rapide des mets ne permet pas un choix assez vaste dans l'utilisation des aliments et, d'autre part, le prix élevé des produits frais (légumes verts, fruits) prive un grand nombre de citadin de leur salubre consommation.

CHAPITRE III

LE SCORBUT EXPÉRIMENTAL

a) LES RÉGIMES SCORBUTIGÈNES

Leur constitution a été dominée par le souci d'obtenir une composition biochimiquement équilibrée, c'est-à-dire où tous les éléments se trouvent dans des proportions capables d'assurer normalement la croissance, le maintien de l'équilibre et la reproduction. Les premiers régimes étaient à base de graines de céréales. Celui de Th. SMITH était composé d'avoine à laquelle on ajoutait, soit du son de froment, soit du beurre, soit du lactate de calcium ou du chlorure de sodium. Plusieurs de ces régimes parmi lesquels ceux de MOURIQUAND et MICHEL, FUNK, HÖLST et FRÖLICH, CHICK et HUME dont nous reparlerons plus loin, étaient à base d'orge et de farine de soja, complétés par du papier filtre, du foin, de la sciure de foin, des laxatifs, du lactose, du chlorure de calcium, du lait, etc...

A titre d'exemple, voici celui que composèrent, en 1918 GIVEN et COHEN :

Farine de soja autoclavée	76,3
Lactate de calcium	2,9
Chlorure de sodium	2,9
Levure de bière	25,9
Lait desséché	11,3

En 1919: LEWIS adopta le suivant:

Caséine	40
Avoine	50
Son	10
Lactate de calcium	1,5
Lait cru	20

Quant à HART, STEENBOCK et ELLIS, ils s'arrêteront à la formule ci-dessous:

Caséine	5
Avoine	69
Farine de luzerne	12,5
Foin broyé	12,5
Chlorure de sodium	1

Les régimes à base de graines étaient multidéficents. Les acides aminés n'étaient pas tous représentés et les éléments minéraux n'étaient pas en quantités suffisantes, notamment le Ca, le Chlore et le Sodium. Le taux de vitamine A était peu élevé, de même la quantité de cellulose. On sait le rôle que joue la cel-

lulose comme aliment encombrant pour l'accomplissement des fonctions intestinales. Le rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$ n'est

pas favorable à la croissance

Au fur et à mesure des expériences, les régimes se sont complétés. L'addition de son apporte de la cellulose et des éléments minéraux (P, K, Mg, Fe). Cependant la ration restait toujours déficiente. Il manquait des acides aminés, du facteur A, du calcium, du chlore et du sodium. On ajouta du foin autoclavé ou de la luzerne desséchée contenant de la cellulose, du facteur A et du calcium; mais la proportion de divers acides aminés restait insuffisante; le chlore et le sodium étaient encore absents. FUNK (1916), puis Mc. COLLUM (1917), eurent l'idée d'ajouter au régime avoine plus son du lait autoclavé. Cet élément apportait des acides aminés, du calcium, du sodium et du chlore. Mais la quantité de lait employé se révéla trop importante; elle variait, en effet, de 60 cm³ à 90 cm³, dose qui provoquait chez le cobaye de la constipation et exigeait le gavage au moyen d'une pipette. Il en résultait une perte de temps et, de plus, on n'était pas certain de la teneur du lait en facteur A, celui-ci variant dans le lait suivant les saisons et la nourriture de la vache. Il pouvait à certains moments être insuffisant et rompre l'équilibre du régime.

Régime Randoïn

M^{me} RANDOÏN a réalisé sous forme de bouillie épaisse un régime dont la composition se rapproche de la nourriture des cobayes (mélange de choux, carottes, pommes de terre et son); les éléments représentés gardent entre eux un rapport satisfaisant. Le régime se compose comme suit :

Farine de haricots blancs	83,5
Levure de bière sèche	3
Graisse de beurre purifiée	5,5
Chlorure de sodium	1
Lactate de calcium	5
Aliment encombrant (papier filtre)..	2

La farine de haricots est riche en facteur B, en acides aminés, sauf cependant en tryptophane; elle renferme une grande quantité d'éléments minéraux (P, K, Mg, Fe, Zn, F, Bo, As, I); de faibles quantités de calcium et très peu de sodium. La levure de bière contient du tryptophane et apporte un supplément de facteur B. La graisse de beurre fournit du facteur A et des matières grasses. Le lactate de chaux permet dans la ration l'établissement d'un rap-

Ca total
port ——— satisfaisant et favorable à la croissan-

P total
ce. ClNa et le papier filtre complètent le régime. La substitution de la nourriture nouvelle au régime naturel se fait progressivement pour éviter des troubles

et une chute de poids initiale. La quantité quotidienne administrée au lapin est de 200 à 300 gr.; chez le cobaye, elle ne dépasse pas 80 à 140 gr. Un gramme du mélange correspond à une calorie.

Les régimes scorbutigènes les plus utilisés en Angleterre sont le régime de Sherman, dont la composition est la suivante:

Avoine.
Son.
Poudre de lait.
Eléments minéraux.

et le régime ci-dessous:

Son.
Avoine.
Jaune d'œuf.
Eléments minéraux.

On les complétait d'un volume déterminé d'huile de foie de morue pour éviter une carence en facteurs A et D.

b) LE SCORBUT EXPÉRIMENTAL

Les nombreux cas de scorbut observés chez les marins participant à de longues expéditions ont toujours frappé l'imagination. Sur les navires norvégiens, cette maladie sévissait autrefois avec une régularité trop souvent répétée. L'observation des symptômes lui fit donner le nom de « ship beriberi »

parce que, à côté des manifestations du scorbut, on constatait d'autres troubles semblables à ceux que l'on observe dans le béribéri (paralyse, troubles sensitifs et cardiaques). Les individus malades guérissaient dès leur retour en reprenant une alimentation normale. On incrimina donc leur nourriture et, par la suite, leur ration fut améliorée par l'utilisation de farine de froment d'excellente qualité. Mais les résultats restaient identiques et le scorbut faisait toujours ses ravages.

En 1907, HÖLST et FRÖLICH furent chargés par le Bureau d'Hygiène de Christiania (Oslo), d'étudier le problème de l'alimentation des marins. Ils firent des expériences sur des cobayes et des pigeons, qu'ils nourrissaient de blé et d'autres céréales. Auparavant, THÉOBALD SMITH avait signalé les symptômes qui apparaissaient lorsque l'on nourrissait les cobayes d'avoine et d'eau : les animaux malades présentaient de fréquentes hémorragies. HÖLST et FRÖLICH pensèrent qu'il s'agissait là de cas de scorbut semblables à ceux qui frappaient les marins. Des expériences renouvelées purent donner les caractères de l'évolution de la maladie. Les cobayes maigrissaient d'abord, puis leur poids devenait stationnaire. Au bout du 18^e et du 20^e jour on remarquait, avec la perte de l'appétit, de la tuméfaction et des douleurs aux articulations ; les selles étaient sanguinolentes, le poids baissait graduellement et la mort survenait au bout de 25 jours environ. A l'autopsie on constatait une forte congestion de la moelle, l'amincissement du tissu osseux, surtout au niveau des épiphyses et un déchaus-

sement très prononcé des dents. Les hémorragies étaient nombreuses et affectaient les principaux organes. Le caractère des lésions retint l'attention des savants. HÖLST et FRÖLICH (1907-1913), après plusieurs expériences, reconnurent les propriétés antiscorbutiques d'un certain nombre de substances, entre autres le citron, l'orange, le chou, le pissenlit et les jus frais que l'on peut extraire de ces végétaux. FUNK classa la substance pourvue de ces propriétés dans le groupe des vitamines. Toutefois, les causes du scorbut pour certains restaient encore mal établies. Les théories les plus variées furent avancées. D'après Mc COLLUM, SIMMONDS et PITZ (1917) le scorbut n'était pas une maladie par carence; ils n'avaient pu le provoquer en l'expérimentant sur le rat avec un régime scorbutigène composé pour la majeure partie de grains d'avoine. Mc COLLUM pensa que le scorbut était une maladie infectieuse. Selon lui, à la suite d'une alimentation défectueuse, il se produirait une libération de toxines déterminée par une stase fécale au niveau du cœcum. Il s'en suivrait une altération des capillaires donnant lieu à l'apparition d'hémorragies. Le remède, pensait-il, était tout indiqué; il suffisait d'administrer au malade purgatifs et laxatifs pour voir disparaître cette affection. MORGEN et BERGER estimèrent qu'elle était due à une intoxication par acidose. PITZ, en 1918, l'attribua à un trouble dans le métabolisme du calcium. La même année, DRUMMOND affirme l'existence d'un facteur soluble dans l'eau, différent du facteur B par certaines propriétés et son pouvoir antiscorbutique. Il l'appela le

« water soluble C ». A partir de ce moment, le scorbut est considéré comme une maladie par carence, une avitaminose mortelle. Enfin en 1920, Mc COLLUM reconnaît que « la substance antiscorbutique est une vitamine indispensable à l'homme et à certaines espèces animales ».

Effets provoqués par l'absence de vitamine C

L'avitaminose C détermine des troubles organiques, des altérations des tissus et des variations de poids chez le cobaye réactif, animal le plus sensible au scorbut. Les variations de poids présentent une allure différente suivant que l'animal est jeune ou adulte. Chez le premier la courbe du développement pondéral est partagée en trois périodes : une période d'incubation pendant laquelle la croissance continue, une deuxième période marquée par une courbe invariable, et enfin une dernière période caractérisée par une chute pondérale conduisant à la mort. Chez l'adulte la courbe ne représente que deux phases : une phase d'équilibre durant laquelle les animaux paraissent normaux et une phase de déclin où les symptômes du scorbut se manifestent et vont en s'aggravant.

Symptômes de l'avitaminose C

Au début de l'expérience, l'état du cobaye paraît normal et semble satisfaisant pendant une période de deux semaines. Au bout de cinq à six jours, on note une sorte d'excitation particulière. L'animal reste

rarement immobile et réagit vivement lorsqu'on veut le saisir. Son pelage est lustré et ses yeux sont brillants. Cependant, vers le quinzième jour, la diarrhée apparaît et l'état de surexcitation fait place à de la torpeur. Le cobaye est ramassé « en boule » ; les poils deviennent hérissés et malpropres. A partir du vingtième jour, les troubles digestifs apparaissent ; les articulations, en particulier celles des membres postérieurs, se gonflent ; les douleurs s'accroissent ; l'animal se tient immobile dans un coin de sa cage et évite le moindre choc. Les selles deviennent hémorragiques, les gencives se congestionnent, les molaires se déchaussent. Chez les jeunes animaux, des fractures se produisent. La respiration devient difficile ; le cobaye, couché sur le côté, les membres raidis, attend la mort, qui arrive entre le vingt-huitième et le trente-deuxième jour.

Anatomo-pathologie

On observe, après la mort de l'animal, de l'ébranlement des molaires, des congestions, des hémorragies multiples (sous-cutanées, intra-musculaires, sous-périostées) dans la région du genou, à la partie externe de la jambe, aux articulations des membres supérieurs, aux intestins, au foie, aux reins, aux capsules surrénales. Cet état est plus marqué encore chez les jeunes cobayes. Les articulations costo-chondrales sont gonflées, boursoufflées ; la moelle osseuse est congestionnée ou hémorragique ; les os sont amincis et très fragiles. Chez les jeunes, dans les régions périarticulaires, le corps se sépare facilement des épi-

physes et la matière osseuse de ces épiphyses, réduite à une mince coque, se brise au moindre contact. Les fractures spontanées ne sont pas rares.

Lésions osseuses scorbutiques

FRANCES TOZER entreprit des expériences à l'effet d'étudier la nature des lésions osseuses des cobayes scorbutiques. Il se spécialisa dans l'observation des jonctions costo-chondrales des cobayes jeunes. Des cobayes soumis au régime scorbutigène furent tués à des intervalles réguliers, et l'on pratiqua, en vue d'un examen histologique, des coupes longitudinales et transversales aux jonctions costo-chondrales. On observa, au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, des lésions de plus en plus accentuées. Dès le début, il se produisait des désordres dans l'alignement des cellules cartilagineuses et des trabécules osseuses. D'autre part, le sang affluait en plus grande quantité dans la moelle osseuse. La maladie s'aggravant, la disposition des éléments envisagés devenait tout à fait irrégulière; les cellules s'éparpillaient et les trabécules devenaient sensiblement plus courtes. L'os fracturé sur l'un des côtés de la jointure, ou sur les deux, laissait apparaître une hémorragie et une masse de tissu conjonctif se développait dans la cavité de la moelle.

Lésions des vaisseaux vasculaires

MARSHALL FINDLAY, en 1921, publia un travail sur les lésions vasculaires. Il soumit une série de cobayes à un régime scorbutigène et les sacrifia l'un

après l'autre. Il constata, au bout d'une semaine et demie, que les capillaires, ainsi que les veinules les plus petites, présentaient des altérations caractéristiques, consistant en une dégénérescence des cellules de l'endothélium. Ces cellules étaient devenues granuleuses. Il nota également que leur tuméfaction cause un ralentissement du courant sanguin par suite de l'obstruction des capillaires et des petites veinules, et qu'il s'ensuit une oxygénation insuffisante des tissus. FINDLAY trouva presque toujours de l'œdème dans les tissus entourant les vaisseaux et des hémorragies interstitielles dans de nombreux organes, en particulier dans les capsules surrénales.

*Modifications apportées par le scorbut
dans les organes et les humeurs du cobaye*

Nous venons d'étudier les altérations des tissus produites par le scorbut. Examinons maintenant les modifications de quelques organes et les changements introduits dans le métabolisme des principes immédiats et de plusieurs autres substances.

On constate une augmentation du volume de la rate et des capsules surrénales. Ces dernières, en outre présentent un piqueté hémorragique. Le foie est congestionné, et l'on y observe des hémorragies interstitielles. Quant à son poids, il varie peu. Les poumons sont dans un état congestif considérable. Les modifications pondérales de la glande thyroïde et parathyroïde sont difficiles à interpréter. D'après BESSENEN, l'épithélium séminal est dégénéré et les ovaires atrophiés.

Le volume de l'urine diminue. On observe de l'albuminurie, indice certain d'une lésion rénale et, en outre, de l'hémoglobinurie. L'urée sanguine augmente. L'animal scorbutique, après avoir épuisé ses réserves adipeuses, attaque ses propres albumines; l'urée sanguine s'élève par suite de l'élimination insuffisante de l'urée urinaire.

Les teneurs du sucre libre et protéidique du sang restent constantes. Ceci prouve que ni le foie, ni le pancréas, ni les tissus qui contribuent à maintenir le taux de sucre libre dans les limites normales ne sont influencés par la vitamine C.

Il y a une diminution très nette du glycogène hépatique. Le foie intervient pour subvenir aux besoins de l'organisme en glucides.

Mais les pertes en glycogène sont réparées dans la période prémortelle; l'assimilation à ce moment reste régulière et le foie fixe encore les glucides des aliments. Le glycogène musculaire, utilisé pour lutter contre une déperdition de chaleur, baisse très nettement.

Les lipides formant les dépôts adipeux diminuent; les protides sont eux-mêmes attaqués lorsque les réserves adipeuses sont épuisées. Le coefficient lipocholestérol

cytique ————— $\times 100$ des organes est modifié.
acide gras

Sa valeur baisse, en général, quand apparaissent les premiers symptômes du scorbut et que se produisent les troubles digestifs et les hémorragies. Dans les capsules surrénales la teneur en cholestérol devient

plus faible, tandis que celle des acides gras ne présente pas de variations.

Les réserves en fer sont rapidement épuisées par suite de la fréquence des hémorragies. Les teneurs du foie se réduisent au fur et à mesure que la maladie évolue.

Le sang s'éclaircit; le calcium du plasma reste constant; la teneur en fibrinogène s'élève; le taux en eau du sang augmente de 10 % environ et la résistance globulaire est extrêmement modifiée.

On observe une rétention chlorurée, le chlore est fixé dans l'organisme sous forme de chlorure de sodium. Chez les cobayes scorbutiques, les quantités de sodium excrétées diminuent et le poids moyen de potassium éliminé s'abaisse. Dans le sérum sanguin le taux de sodium s'élève faiblement; l'augmentation est plus nette dans le sang total, tandis que le poids de potassium s'affaiblit progressivement. En effet, le potassium est plutôt excrété par la voie fécale que par la voie rénale. Les hémorragies intestinales entraînent une grande quantité en dehors de l'organisme.

Pour les mêmes raisons, les muscles striés s'appauvrissent en K; ils s'enrichissent, au contraire, en Na et en eau.

DEUXIÈME PARTIE

AUTOUR DU PROBLÈME
DE LA VITAMINE C

CHAPITRE PREMIER

ESSAIS D'EXTRACTION

La préparation des solutions concentrées et des produits solides dans lesquels la vitamine C représentait l'élément essentiel a pu faciliter aux observateurs, dans le passé, les manipulations et permettre d'observer de plus près les caractères de cette substance. C'était, en outre, un pas en avant, un progrès réalisé dans la voie de sa découverte, ou tout au moins, de son étude.

Des méthodes générales d'extraction ont été essayées par FUNK, G. BERTRAND et SEIDELL. Applicables surtout à la vitamine B, elles n'en constituaient par moins des indications sur les méthodes à utiliser. L'une de celle-ci, basée sur l'emploi de l'alcool, ne donnait qu'un produit de faible valeur. Une autre utilisait le pouvoir dissolvant de l'eau acidulée; l'extrait, obtenu se montrait plus actif. De même, ZÉNON WIEVZKOWSKI traitait les milieux riches en vitamine par une solution acide et essayait l'extraction au moyen du nitrate mercurique ou du nitrate d'argent. Après l'élimination de l'argent, dans le deuxième procédé, il obtenait une solution à pouvoir

élevé et la purifiait en formant un picrate cristallisé. Celui-ci, décomposé, livrait une substance qui se dissolvait dans l'eau.

BEZSSONOFF, en 1923, par la méthode à l'acétate de plomb obtenait un produit concentré en partant du jus de chou. C'était une poudre d'un blanc jaunâtre, très hygroscopique et très autoxydable après légère hydrolyse.

Cette préparation à la dose de 2 gr. 5 correspondait à 100 cm³ de jus initial et, donnée aux cobayes à raison de 0 gr. 10 par jour, elle les préservait du scorbut. Elle renfermait de 33 à 46 % de sucre réducteur. Plus tard, en 1925, BEZSSONOFF apportait quelques modifications à sa méthode, qui lui permettait d'obtenir un produit purifié.

Toutes les opérations, étant donnée la fragilité de la vitamine, étaient conduites dans une atmosphère d'N ou dans le vide. L'azote était purifiée par son passage sur du cuivre incandescent. Les divers temps de la préparation étaient les suivants: Les feuilles vertes du chou sont écrasées dans une presse; le jus exprimé tombe aussitôt dans un récipient rempli d'azote. Ce jus est mélangé avec une solution d'acétate neutre de plomb. Il se forme un précipité qui est séparé sous pression d'N. Mais au lieu de faire agir directement H²S comme dans la préparation du produit brut, on ajoute une quantité supplémentaire d'acétate neutre de plomb et l'on alcalinise ensuite avec une solution de soude caustique jusqu'à l'obtention du P_H 8,2. On sépare le précipité formé sous pression d'N, on le lave à l'eau et le dissout dans une

solution d'acide acétique à 10 %. Cette solution est introduite dans un récipient rempli d' H^2S gazeux. Un brassage continu facilite la formation de sulfure de plomb. Ce sulfure est séparé et la solution est évaporée dans le vide jusqu'à consistance pâteuse. On reprend par l'eau distillée et l'on répète plusieurs fois ces opérations. Ensuite, on additionne la solution de cinq fois son volume d'alcool à 95°, et on enlève le précipité. Le liquide actif est concentré et le résidu épuisé par l'alcool absolu. On reprend l'extrait alcoolique par l'acétone et, enfin, on évapore à sec.

Cette préparation préservait, à la dose de 2 mg., le cobaye du scorbut. Elle se présentait sous la forme d'aiguilles cristallines, incolores, très hygroscopiques et très oxydables, solubles dans l'eau, insolubles dans l'éther, le benzène et le toluène, enfin, constituées uniquement par du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène.

La seule différence qui existait dans l'extraction, en partant du jus de citron, était l'élimination du plomb par le sulfate de magnésie au lieu de l'élimination par H^2S .

CHAPITRE II

LA DUALITÉ DE LA VITAMINE C

Cette question a été posée assez longtemps pour qu'il soit utile de donner les raisons qui ont permis de la soutenir. Elle avait paru s'affirmer à la suite des travaux de BEZSSONOFF, sur l'établissement d'un régime scorbutigène spécifique. En 1918, CHICK, HUME et SKELTON avaient réalisé une composition alimentaire dont les éléments étaient représentés par de l'avoine, du son et 60 cm³ de lait de vache chauffé à l'autoclave, pendant une heure, à 120°. Ce régime ne se révélait pas nettement scorbutigène et présentait en outre une déficience en facteurs liposolubles. BEZSSONOFF, se basant sur des constatations faites en 1925 par HAUGE et CARRIK, relatives au jaune d'œuf, substitua celui-ci au lait. Le lait, en effet, même chauffé à l'autoclave renfermait encore des traces de vitamine C, tandis que le jaune d'œuf était dépourvu de ce principe et apportait au régime un supplément de facteurs liposolubles. L'application au cobaye de ces deux régimes venait confirmer l'hypothèse de BEZSSONOFF. Les cobayes soumis en même temps au régime Chick et Hume, mouraient à des

dates variables et présentaient des signes d'une carence en vitamines liposolubles (rupture des incisives, fragilité anormale du squelette). Avec la nouvelle formule de Bezssonoff :

Avoine.

Son.

Levure de boulanger.

Jaune d'œuf délayé dans l'eau.

on constatait, en plus de morts simultanées vers le trentième jour, ce qui était l'indice d'un régime bien équilibré, la présence, à l'autopsie, de tous les symptômes scorbutiques et de ceux-là seulement : relâchement des molaires, hémorragies dans la région chondrocostale, des ruptures des côtes et de la désagrégation des os du genou (tibia et rotule). Ce régime était donc strictement scorbutigène et, en outre, bien équilibré.

BEZSSONOFF fit des expériences avec les deux régimes ainsi constituées et releva des contradictions sur la valeur des substances qui étaient destinées à les compléter. Il suffisait d'ajouter 1 cm³ de jus frais de citron à une ration Chick-Hume pour réaliser un régime complet, et 3 cm³ de ce même jus frais à une ration Bezssonoff. Nous savons, de plus, que la composition alimentaire de Chick-Hume comprenait déjà une dose de 60 cm³ de lait autoclavé. Donc, 60 cm³ de lait autoclavé et 1 cm³ 5 de jus frais de citron constituaient une dose antiscorbutique, c'est-à-dire suffisante pour préserver du scorbut des cobayes de 400 gr. (poids que l'on avait adopté pour les épreu-

ves). Cette dose était égale aux 3 cm³ de jus frais de citron nécessaires pour compléter le régime spécifique de BEZSSONOFF. D'autre part, JEPHCOTT et BACHARACH (1921), ont montré qu'il fallait 104 cm³ de lait frais pour maintenir en état de santé des cobayes de même poids. La moitié, ou 52 cm³, correspond donc à 60 cm³ de lait autoclavé. Il était anormal de ne pas constater une perte plus sensible du pouvoir antiscorbutique du lait. En effet, l'expérience nous montre que l'autoclavage pendant une heure à 120° diminue de moitié l'action antiscorbutique du jus de citron et, comme nous le verrons plus loin, la vitamine C résiste mieux à l'action de la chaleur dans un milieu acide que dans un milieu neutre. DELF (1920) a montré qu'un chauffage d'une heure, à l'air libre, à 100°, réduit à 1/3 et même à 1/7 la quantité initiale de facteur C, présente dans le jus des végétaux à réaction neutre. Or, la réaction du lait est neutre au moment de sa sortie de l'autoclave et sa température est voisine de 100°. Il semble difficile d'admettre que l'autoclavage du lait conduit à une perte en vitamine C moins élevée que celle constatée après le chauffage des jus acides de citron.

De même, comment expliquer qu'en introduisant 60 cm³ de lait autoclavé dans un régime scorbutigène on double le pouvoir de 1 cm³ 5 de jus frais? On ne pouvait répondre à cette question qu'en supposant la présence de deux éléments composant la vitamine C. L'un sensible à la chaleur, C¹, l'autre plus stable, C². Le premier manifesterait son action dans le jus de citron frais; le deuxième, contenu dans le lait auto-

clavé, viendrait compléter une dose insuffisante de la même fraction présente dans le jus de citron.

D'autres expériences ont été faites pour résoudre ce problème. BEZSSONOFF constata que la préparation purifiée de vitamine C, obtenue par le procédé à l'acétate de plomb, préservait du scorbut à la dose de 0 mg. 4 par 100 gr. de cobaye, les cobayes recevant le lait autoclavé. Cette substance devait correspondre à la fraction C¹.

Au moment où BEZSSONOFF fit ces expériences, il ne disposait pas encore de ce produit, mais d'une préparation qu'il désigna sous le nom de vitamine C brute. Si ses suppositions étaient exactes, pensa-t-il, il devait prouver :

1° Que cette préparation était privée d'effet en l'absence du lait.

2° Qu'elle devait recouvrer son efficacité quand le lait chauffé est remplacé par une petite dose de jus de citron chauffé, autrement dit quand la fraction C¹, représentée par la préparation, viendrait s'ajouter à la fraction C², supposée présente dans le jus de citron chauffé à l'autoclave.

3° Que la dose du jus chauffé en l'absence de la préparation n'exerce qu'une action antiscorbutique négligeable.

40 mg. de la préparation C¹ complétés par 1 cm³ 5 de jus de citron chauffé furent jugés suffisants pour préserver du scorbut des cobayes de 500 gr. soumis au régime de Bezssonoff ; 180 mg., sans jus de citron se révélaient insuffisants ; en abaissant cette dose à 50 mg., et en ajoutant 1 cm³ 5 de jus de citron chauffé,

fé, les cobayes ne présentaient aucun symptôme de scorbut. Il était permis de conclure que le jus de citron devait son effet antiscorbutique à la fraction C^2 qui n'existait pas dans la vitamine C brute. 2 cm³ de jus de citron chauffé, ajoutés au régime de base n'ont aucun effet antiscorbutique. Il manquait sans doute une quantité de jus de citron frais qui apporterait le facteur C^1 ; en effet, on constate qu'avec 3 cm³ 5 de jus de citron autoclavé et un de 1 cm³ 5 de ce même jus frais, les cobayes ne meurent qu'au bout du 58^e jour du régime. Ce fait devait appuyer encore l'hypothèse de la dualité de la vitamine C. SCOTTI FOGLIENI (1926) fit des remarques analogues. Il soumettait à la distillation à 120° du jus de citron frais. Le distillat était recueilli à part et le résidu était lavé à l'eau chaude et filtrée. Les résultats des expériences faites sur ces deux parties ne se montraient pas toujours concordants. Dans certains cas, on obtenait, avec le distillat, un gain sensible du poids du cobaye; le filtrat ne permettait que le maintien de l'équilibre pondéral. En somme, on était d'accord pour constater l'effet supérieur du mélange du filtrat et du distillat par rapport au filtrat seul. Celui-ci correspondant au jus chauffé à l'autoclavé aurait contenu les deux fractions de la vitamine C et le distillat la fraction C^1 . L'une C^2 préserverait les cobayes du scorbut, l'autre la fraction C^1 n'exercerait qu'une action favorable sur l'augmentation pondérale, l'effet combiné des deux pouvant seul assurer le bon état général des cobayes soumis au régime scorbutigène strict.

CHAPITRE III

LA VITAMINE C

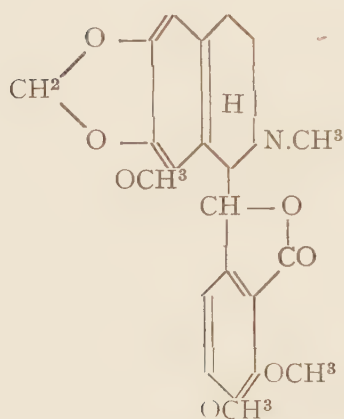
ET LES RECHERCHES DE O. RYGH

Le problème de la vitamine C allait entrer dans une nouvelle phase avec les recherches de Ottar RYGH. Les études de BEZSSONOFF et de SCOTTI FOGLIENI conduisirent à admettre l'existence de deux éléments actifs constituant la vitamine C, l'un sensible à la chaleur, l'autre résistant, tous les deux unissant leur action pour donner toute sa valeur au facteur encore énigmatique, la vitamine C. D'après SCOTTI-FOGLIENI, l'une de ces deux fractions, C², prévenait chez les cobayes l'apparition des symptômes scorbutiques, l'autre C¹ exerçait une action favorable sur l'accroissement pondéral. BEZSSONOFF avait caractérisé l'une de ces substances en employant le réactif Folin-Denis, modifié par lui-même. L'acide monomolybdophosphotungstique, réactif des diphénols, donnait une coloration bleue avec l'une des fractions. Comme la réaction se produit quelquefois à la faveur d'un court chauffage, BEZSSONOFF l'attribua à la substance C²; il l'appela le diphénol C.

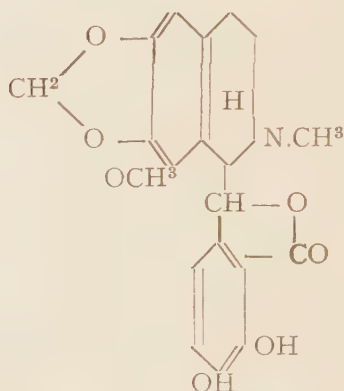
Le point de départ des recherches de O. RYGH, chimiste norvégien, fut l'idée que la vitamine C était un polyphénol. Il pensa que ce corps pouvait avoir des propriétés basiques et se combinait sous forme de sels avec les acides des milieux biologiques. Ceci expliquait pourquoi on ne pouvait jusqu'alors extraire la vitamine C par l'éther éthylique. Si cette supposition était exacte, il était facile de déplacer la faible base avec un alcali et la vitamine libérée pouvait être extraite par l'éther éthylique. L'expérience, tentée en décembre 1931, confirma cette supposition. RYGH concentra dans le vide du jus de citron à $1/5$ et à $1/6$ de son volume initial, à une température ne dépassant pas 25° . Le milieu fut débarrassé des matières grasses par agitation avec de l'éther exempt de peroxyde. Le jus fut ensuite ramené à une réaction légèrement alcaline par addition de soude et épuisé à nouveau par agitation avec de l'éther. On évapora cet éther et le résidu fut desséché en présence de sulfate de soude. Toutes ces opérations étaient conduites à l'abri de l'air, dans une atmosphère d' N ou d'anhydride carbonique. 40 litres de jus donnent environ 50 mg. d'un produit huileux, lourd, dans la masse duquel sont pris des cristaux. Traité par l'acide tartrique, il donne une solution que l'on administre au cobaye. Les résultats constatés sur des cobayes soumis au régime Bezssonoff et Randoïn furent satisfaisants. La substance extraite par RYGH paraissait agir entre des doses de 0 mg. 001 à 0 mg. 0001. Les cobayes, auparavant scorbutiques, guérissaient et regagnaient leur poids après 14 jours de traitement.

RYGH constata que la quantité de cristaux mélangée à la substance huileuse augmentait avec les oranges vertes. C'est ainsi que le rendement pouvait atteindre 2 gr. 4 pour 40 l. de jus. Les oranges non mûres étant privées d'action antiscorbutique, il supposa que la substance cristalline devait être le corps qui engendrait la vitamine, la provitamine C. L'étude chimique fut entreprise et démontra qu'on était en présence d'un alcaloïde de formule $C^{22}H^{23}NO^7$, la narcotine. La méthode titrimétrique donna un poids moléculaire de 412. Plus tard, LALAND (1932) identifia cette narcotine dans d'autres végétaux antiscorbutiques et la trouva à l'état de traces dans le lait. RYGH pensait que la transformation de la provitamine C ou narcotine en vitamine s'opérait pendant la maturation des fruits, sous l'influence des rayons ultra-violets. Pour prouver ce fait, il soumit la narcotine inactive à l'ultra-violet et expérimenta le produit obtenu. La narcotine non irradiée était dépourvue d'action antiscorbutique, tandis que l'irradiée manifestait ses propriétés chez le cobaye soumis à un régime scorbutigène. Le trait frappant était l'absence de lésions scorbutiques. Toutefois, les animaux traités, dépérissaient et succombaient dans le même délai que les témoins. RYGH constata que l'action des graines germées transformait la narcotine en une substance phénolique douée de propriétés antiscorbutiques. Il chercha à la transformer en vitamine et obtint une série de produits dérivés: la cotarnine, les acides opianiques et cotarniniques, la norméconine, l'anhydrocotarnine-phthalide, la narcotine -N- oxyde, la diméthyl-, la méthyl-, et la nornarcotine.

Les trois derniers corps, qui sont les mono-, di-, et triphénols, obtenus par la déméthylation de la narcotine étaient, d'après RYGH, pourvus d'action antiscorbutique. Le plus actif semblait être la méthylnornarcotine :



Narcotine



Méthylnornarcotine

les deux autres ne devant leur activité qu'à ce qu'ils se trouvaient mélangés au diphérol. Pour l'obtenir, on faisait agir sur la narcotine l'acide chlorhydrique concentré à 100° pendant 8 jours. On déméthylait de cette façon les deux groupements méthoxyl en position ortho de la narcotine. On obtenait un orthodiphérol sous forme de chlorhydrate, cristallisé en aiguilles incolores, soluble dans l'eau et l'alcool dilué. Cet orthodiphérol, libéré par les alcalis, s'oxydait très facilement en donnant un produit brun. La méthylnornarcotine ainsi obtenue fut appelée le « diphérol C ». Les premiers essais de son activité parurent

satisfaisants. Administrée à des cobayes soumis au régime Sherman à des doses variant de 0 mg. 0001 à 5 mg., elle permettait les constatations suivantes: L'action du diphénol C était pleinement efficace à la dose de 0 mg. 02. L'étude histologique et röntgengraphique des pattes, côtes, dents, épiderme et surrénale, décelait l'absence de lésions scorbutiques, mais à aucune dose les cobayes ne purent être préservés d'un dépérissement les conduisant à la mort dans les mêmes délais que les témoins. Puis les premières contradictions apparurent. Une quantité supérieure de cette substance, environ 0 mg. 1 n'empêchait plus l'apparition des lésions scorbutiques sur les mêmes organes. RYGH pensa aux effets de l'hypervitaminose constatés surtout avec le facteur D; cependant, on put faire ingérer 1 gr. de déphénol C à un lapin sans qu'il en éprouvât aucun malaise. 5 cm³ de jus d'orange chauffés pendant 3 heures à 100°, ajoutés à un régime de base en plus de la dose optimale de méthyl-nornarcotine, permettaient de maintenir en bon état de santé les cobayes à l'épreuve; on constatait même chez ces animaux une augmentation de poids. Le jus d'orange chauffé, ajouté au régime scorbutigène privé du principe isolé par RYGH ne pouvait empêcher le dépérissement des cobayes et l'apparition au bout de 42 jours des lésions scorbutiques.

Reprenant l'idée de BEZSSONOFF, RYGH pensa que l'activité antiscorbutique était due à deux facteurs, contenus tous les deux dans la partie huileuse du jus d'orange, le diphénol C et une autre base active. Le premier posséderait une action antiscorbutique spé-

cial, le deuxième entretiendrait le bon état général des cobayes soumis au régime scorbutigène. Toutefois, cette supposition ne lui permettait pas d'expliquer certaines anomalies. Une dose de 0 mg. 001 du produit huileux était suffisante pour préserver les cobayes du scorbut et une quantité vingt fois plus grande de diphénol C ne prévenait que l'apparition des lésions scorbutiques, cette substance ne pouvant empêcher chez les animaux un dépérissement et une mort rapide. Ainsi, il ne restait plus qu'à définir, qu'à identifier le deuxième facteur. L'un et l'autre, suivant BEZSSONOFF, pouvaient provenir de la narcotine. RYGH pensait avoir dégagé les propriétés de la méthylornarcotine. Il avait réalisé sa synthèse par condensation de la nitro- nor- méconine avec la cotarnine et croyait même qu'avec une dose de 0 mg. 1 de ce produit il avait guéri un cas de scorbut humain.

Les résultats des expériences faites par SMITH, ZILVA, GRANT, DALMER et MOLL (1932) sur l'activité de la méthylornarcotine furent négatifs. EGGLETON et HARRIS, de leur côté, démontrèrent que la synthèse de la vitamine C chez les plantes est indépendante de l'action des radiations ultra-violettes. Quant à DALMER et MOLL (1932), GRANT, SMITH, ZILVA (1932) ils ne purent isoler la narcotine du jus d'orange verte en employant la méthode de Rygh et Laland. Enfin, il est utile de dire que l'expérience de Rygh sur un cas de scorbut humain est sujette à caution, le régime de base étant composé de lait, de gâteaux de viande, et de poisson. HARRIS (1932) a montré que le lait employé devait certainement con-

tenir une petite quantité de vitamine C. L'utilisation d'un tel régime venait détruire la valeur de l'observation de RYGH.

Les raisons précitées amenèrent les savants à reprendre la question sur une autre base. Déjà, au cours des années précédentes, des chercheurs s'étaient engagés dans une voie nouvelle, encouragés par la magnifique découverte de Szent György.

TROISIÈME PARTIE

CARACTÉRISATION
DE LA VITAMINE C
(Acide ascorbique)

CHAPITRE PREMIER

TRAVAUX DE SZENT GYORGYI

Les travaux de ce savant ont eu pour origine l'étude des phénomènes d'oxydation en biologie. Les données de nombreux auteurs sur les caractères du facteur antiscorbutique avaient attiré depuis longtemps son attention. BEZSSONOFF, en 1920, avait montré l'influence du broyage des fruits et des légumes sur la vitamine C. Les cellules végétales rompues mettaient en liberté des diastases oxydantes dont l'action déterminait la perte du pouvoir antiscorbutique des jus ainsi obtenus. On connaissait, en outre, le rôle de l'acidité sur la stabilité de la vitamine C : l'action des enzymes était entravée ou retardée en milieu acide. Une autre propriété fréquemment observée, était le pouvoir réducteur très marqué d'un grand nombre de jus de plantes. Les recherches relatives au pouvoir antiscorbutique et les recherches concernant les substances réductrices étaient aussi fréquemment imbriquées. Une sorte de parallélisme s'établit dans l'étude de ces deux propriétés et il devenait évident que les oxydations qui s'effectuaient au

sein des tissus n'étaient pas incompatibles avec l'existence de la vitamine antiscorbutique.

C'est en se consacrant à l'étude de ces phénomènes qu'Albert SZENT GYÖRGYI, professeur à l'Institut de Chimie Médicale de l'Université de Szeged (Hongrie), acquit des notions nouvelles sur la nature chimique de la vitamine C. L'examen des systèmes d'oxydation les mieux connus, le système du cytochrome et celui de la phénoloxydase, le premier considéré comme le seul système animal, le deuxième comme le système végétal classique, ne donnait pas à SZENT GYÖRGYI toutes les satisfactions désirables. Alors que ses recherches l'éclairaient quelque peu sur la fonction de la partie médullaire de la glande surrénale, elles ne lui apportaient aucune clarté quant à la fonction de la partie corticale de cette glande, qui paraissait jouer un rôle important dans le processus d'oxydation. Il chercha un moyen d'élucider la question en étudiant les plantes qui ne possédaient pas de phénoloxydase. On nomma celles-ci « plantes peroxydasiques » parce qu'elles contenaient toutes une enzyme : la peroxydase. Les oxydations subies par les sucs ou les macérations aqueuses des plantes sont en relation avec la présence de ce ferment qui a pour rôle de favoriser la décomposition des peroxydes.

Ce phénomène est bien caractérisé chez un grand nombre de végétaux (Champignons, Ombellifères, Solanées, Composées, etc.), et se manifeste par la coloration en bleu de l'émulsion de résine de Gaïac, mais seulement après addition d'un peroxyde, l'eau oxygénée, par exemple. Si l'on ajoute à de l'adréna-

line, ou à un autre phénol, des traces de peroxyde en présence de peroxydase, le système se colore, le phénol ayant été oxydé par le peroxyde. Avec un suc de plante peroxydasique, le phénol et l'eau oxygénée produisent la même réaction. SZENT GYÖRGYI observa que si, à certains jus végétaux de cette deuxième catégorie, c'est-à-dire à certains jus de plantes peroxydasiques, on ajoutait de l'eau oxygénée progressivement, mais seulement à petites doses, la coloration bleue n'apparaissait pas en présence de l'émulsion de résine de Gaïac. Il fallait, pour constater l'absence de coloration, que le jus de plante soit préparé rapidement et soumis à l'expérience sans délai. SZENT GYÖRGYI donna l'explication de ce phénomène. Les premières quantités d'eau oxygénée n'agissaient pas, parce qu'elles servaient à oxyder une substance réductrice ou un groupe de substances réductrices contenues dans le jus et qui formaient le « facteur réducteur » (reducing factor). La teinte bleue n'apparaissait seulement qu'après l'addition d'une quantité relativement grande d'eau oxygénée. Ce facteur réducteur réduisait non seulement l'eau oxygénée, mais aussi les solutions aqueuses d'iode, le nitrate d'argent en milieu neutre, l'iodure même en solution acide, l'acide phosphotungstique additionné d'un peu d'ammoniaque. La vitesse d'oxydation est fortement diminuée par l'action de la chaleur et par les cyanures, de sorte qu'on peut conclure que l'oxydation est catalysée par les ferments. Elle est donc indirecte et due à une peroxydase. L'oxydation du facteur réducteur par l'eau oxygénée est extrême-

ment rapide; elle est complète en moins de cinq secondes et, en outre, quantitative. Il faut, de plus, noter que SZENT GYÖRGYI prouvait, ce qui est un fait d'une haute importance, qu'elle était réversible. Le facteur réducteur, oxydé par l'action combinée de l'eau oxygénée et de la peroxydase, peut être régénéré quantitativement par un réducteur doux, en particulier H^2S . De même, sans réaction chimique provoquée, le facteur réducteur oxydé réapparaît dans le jus de plante au bout d'un certain temps.

Cette faculté est due probablement à des enzymes; car la régénération n'a pas lieu lorsqu'on les détruit par la chaleur. SZENT GYÖRGYI pensa que le facteur réducteur reliait les différentes enzymes oxydantes en un système dans lequel il jouait un rôle central. Sa fonction biologique, selon lui, résidait principalement dans son pouvoir d'oxydo-réduction. Il faisait partie d'un système d'oxydation naturel et devait jouer un rôle capital dans le processus de la respiration cellulaire. Des phénomènes identiques à ceux qui se passaient chez les plantes pouvaient être observés chez l'animal. Les oxydations, dont les glandes surrénales étaient le siège, devaient être de même nature que celles qui s'effectuaient au sein de la cellule végétale. SZENT GYÖRGYI démontra que la cortisurrénale contenait une quantité importante d'un puissant agent réducteur qui, au moment de ses recherches, ne semblait présent dans aucun autre organe à des concentrations semblables. Il montra de même qu'elle réduisait le nitrate d'argent et se colorait en noir, tandis que la médullaire restait intacte.

Puis, en 1928, il isola, en partant de la cortico-surrénale, une substance cristallisée. Il en étudia la nature chimique et constata qu'elle se rattachait au groupe des sucres. Ses propriétés lui indiquaient qu'il s'agissait, sans doute, d'un isomère inconnu de l'acide glycuronique; il l'appela l'acide « hexuronique ».

En outre, après ces recherches sur la surrénale, SZENT GYÖRGYI réussit à extraire du jus d'orange et du jus de chou un constituant également cristallisé, identique au corps provenant de la cortico-surrénale.

a) L'OXYDATION ET LA RÉDUCTION DE L'ACIDE HEXURONIQUE

Par oxydation ménagée, en faisant agir à froid l'iode ou le nitrate d'argent, l'acide hexuronique perd deux atomes d'hydrogène. Les atomes d'hydrogène libérés peuvent être mesurés par titrage acidimétrique en utilisant un indicateur d'acide fort. A ce stade l'oxydation est dite réversible; le produit obtenu peut être réduit quantitativement par des réducteurs tels que H^2S ; les atomes d'H libérés dans la première oxydation viennent se fixer à nouveau sur la molécule. Le produit de l'oxydation ménagée possède encore la propriété de réduire à chaud la liqueur de Fehling. A un stade plus avancé d'oxydation obtenue par les réactifs précédents employés à chaud ou par l'action de l'O atmosphérique catalysé par une trace de Cu, la réaction n'est plus réversible. L'autoxydation de l'acide hexuronique est catalysée par Cu, les

ions OH; elle l'est peu par le fer ou le manganèse; elle est inhibée par les cyanures. Le facteur réducteur, on l'a vu plus haut, est oxydé par les peroxydes et la peroxydase. Avec les produits purs, on ne peut observer ce phénomène: la peroxydase purifiée n'a aucune action sur l'acide hexuronique cristallisé. D'après SZENT GYÖRGYI, l'oxydation rapide qui se produit dans les sucs de plantes serait catalysée par des phénols. Ceux-ci seraient oxydés par les peroxydes et la peroxydase et donneraient des quinones. Les quinones, à leur tour, oxyderaient l'acide hexuronique en fixant ses atomes d'H labiles et reviendraient à leur forme phénolique primitive. En étudiant la respiration de chou, SZENT GYÖRGYI a constaté que l'oxygène entre d'abord en combinaison avec une enzyme auquel il donne le nom d'hexoxydase.

b) LE POTENTIEL OXYDO-RÉDUCTEUR
DE L'ACIDE HEXURONIQUE

D'après WIELAND, beaucoup d'oxydations biologiques anaérobies sont des deshydrogénations dans lesquelles l'H libre est fixé sur des accepteurs appropriés. Ceux-ci régleraient l'utilisation de cet hydrogène et, suivant les besoins du milieu cellulaire, les libéreraient soit pour créer de l'énergie, soit pour produire des synthèses, c'est-à-dire pour élaborer de la matière vivante. Ils s'opposent à la combustion totale et conservent l'équilibre du milieu vivant. Il existe, en effet, une relation d'entre les formes oxydées et réduites d'un système oxydo-réducteur, la

concentration en ions H et la pression d'H moléculaire en équilibre dans le milieu considéré, autrement dit le rH ou potentiel d'oxydo-réduction, le rH étant le logarithme de l'inverse de la pression d'H gazeux en équilibre avec le milieu. Le potentiel de réduction, ou potentiel d'oxydo-réduction, est la différence de potentiel entre le milieu et l'électrode d'H. Un des systèmes de potentiel de réduction les plus connus est celui du glutathion.

L'acide hexuronique, qui jouerait le même rôle que le glutathion, est considéré comme un transporteur d'H fonctionnant dans le processus suivant :



L'acide hexuronique n'agit pas seulement comme tampon ; grâce à un potentiel d'oxydo-réduction élevé il accélère les oxydations.

CHAPITRE II

IDENTIFICATION DE LA VITAMINE C

a) LES PROPRIÉTÉS ANTISCORBUTIQUES DE L'ACIDE HEXURONIQUE. THÉORIES SUR L'IDENTITÉ DE LA VITAMINE C ET DU PRINCIPE RÉDUCTEUR.

Lorsque SZENT GYÖRGYI isola l'acide hexuronique en 1928, il conclut de suite qu'il était identique à la vitamine C. En 1924, ZILVA, en collaboration avec CONNEL avait cru démontrer que le pouvoir réducteur et l'activité antiscorbutique étaient indépendants. Certains extraits obtenus par ZILVA présentaient, en effet, un pouvoir réducteur, mais pas d'activité antiscorbutique et, inversement, certaines préparations antiscorbutiques étaient dépourvues de propriétés réductrices. La vitamine C et le facteur réducteur ne pouvaient être identiques. De même, lorsqu'on oxydait le facteur réducteur, l'activité antiscorbutique devenait labile. Ces observations furent confirmées par TILLMANS. ZILVA fut donc amené à considérer que la vitamine C se présentait généralement dans la nature, associée à des substances satellites exerçant sur elle une action protectrice en raison de leur pouvoir réducteur.

SZENT GYÖRGYI avait entrepris de longues recherches sur une substance phénolique apparentée aux flavonols, qu'il trouvait en quantité assez grande dans le jus de citron. Cette substance, isolée par l'acétate de plomb, présentait des propriétés réductrices. Ce fait pouvait expliquer pourquoi certains jus obtenus par ZILVA et possédant un pouvoir réducteur élevé n'avaient aucune action antiscorbutique.

Mais TILLMANS montra qu'il existait une relation entre le taux de vitamine C et le pouvoir réducteur mesuré sur des sucres de plantes et des jus de fruits avec le 2-6-dichlorophénolindophénol. L'identité de l'acide hexuronique et du facteur antiscorbutique ne pouvait plus faire de doute, ainsi que SZENT GYÖRGYI le démontra d'ailleurs, à son tour, en 1932. Cependant, ZILVA continuait à objecter que la dose de l'acide hexuronique utilisée par SZENT GYÖRGYI pour préserver les cobayes du scorbut, c'est-à-dire un milligramme, était trop élevée pour croire à son action; à son avis le corps obtenu par SZENT GYÖRGYI n'était pas pur; le pouvoir de la vitamine devait lui être supérieur. Il prétendait avoir isolé un produit dont l'activité était plus grande que celle de l'acide hexuronique. Mais ultérieurement, de nombreux expérimentateurs confirmèrent l'exactitude des conclusions du savant hongrois.

RYGH pensait que l'action de la substance extraite par SZENT GYÖRGYI n'était nullement due à l'acide hexuronique, mais à la présence de traces de méthyl-nornarcotine. Il compara l'acide hexuronique, par rapport à ses propriétés, à une substance de la même

famille, l'acide glycuronique, lui aussi réducteur et se présentant en général dans la nature en combinaison avec d'autres constituants (phénols, etc...). O. et A. RYGH ont cru que les acides apparentés à l'acide glycuronique: hexuronique, galacturonique, etc..., étaient interchangeables dans cette combinaison et que leur activité était due à la méthylornarcotine. Un échantillon d'acide glycuronique, préparé sous sa forme lactone, fut fourni par HIRST, pour vérifier cette hypothèse. L'acide glycuronique ajouté à une solution de méthylornarcotine ne possédait aucune action antiscorbutique. RYGH ne pouvait donc accorder la même valeur à ces différents acides. Plus tard, COX, HIRST, REYNOLDS prouvèrent que l'acide hexuronique avait une structure particulière. RYGH pensait, d'autre part, que la méthylornarcotine était inactive parce qu'obtenue par une hydrolyse trop violente. Cette hypothèse aussi ne fut pas confirmée; car dans le mélange d'acide glycuronique et de méthylornarcotine, celle-ci avait été obtenue par un procédé spécial, permettant une hydrolyse modérée.

Le produit de Rygh n'avait pas été isolé en partant de substances antiscorbutiques; il ne s'y manifestait que par des réactions peu spécifiques et il n'était préparé qu'artificiellement, soit par dégradation (déméthylation de la narcotine), soit par synthèse.

L'hypothèse de BEZSSONOFF sur la dualité du facteur C était également rejetée, le facteur C¹, le plus sensible à la chaleur étant représenté par l'acide hexuronique, qui suffisait seul à déterminer une action antiscorbutique.

b) SPÉCIFICITÉ DE L'ACIDE HEXURONIQUE
COMME FACTEUR ANTISCORBUTIQUE

Les caractères du facteur réducteur, ou acide hexuronique, et ceux de la vitamine C, nous venons de le voir, paraissaient étroitement liés. Ces deux éléments pouvaient être identiques; il s'agissait de le démontrer.

La première expérience tentée dans cette voie a été celle de Albert SZENT GYÖRGYI et de Joseph-Louis SVIRBELY en 1932. Si l'on pouvait prouver que l'acide hexuronique, isolé du jus de citron, avait la même activité que le jus de citron lui-même le problème serait en partie résolu. C'était déjà apporter un argument de valeur en faveur de cette théorie. SZENT GYÖRGYI et SVIRBELY comparèrent le pouvoir antiscorbutique du jus de citron à celui d'une quantité d'acide hexuronique extraite des glandes surrénales de bœuf. Ils avaient choisi la glande surrénale comme milieu d'extraction pour éviter une objection facile. Si l'acide hexuronique avait été isolé du jus de citron ou d'une plante on aurait pu penser que l'activité observée était due à une substance à pouvoir antiscorbutique plus élevé.

Un groupe de cobayes reçut une dose quotidienne de un milligramme d'acide hexuronique en plus du régime de base Sherman. La ration d'un deuxième groupe fut complétée de un centimètre cube de jus de citron. Le troisième groupe était constitué par les animaux témoins soumis au régime scorbutigène strict. La mort de ces derniers se produisit au bout

d'une période de 20 à 34 jours. A l'autopsie ils présentaient, les uns et les autres, tous les symptômes du scorbut. Ceux qui bénéficièrent d'une dose de un centimètre cube de jus de citron n'étaient que légèrement atteints. Les animaux du premier groupe paraissaient en bon état de santé; leur croissance était normale. Une partie fut tuée au bout de 55 jours, l'autre après une épreuve de 90 jours; à l'autopsie on ne décelait aucune trace de scorbut.

L'échantillon d'acide hexuronique n'était plus récent au moment où il fut employé par les deux savants; il avait été inévitablement exposé à l'air. Après extraction, une petite quantité d'acide était dissoute dans l'eau et conservée dans un petit flacon à une température de -18° dans une atmosphère de CO^2 . Il semblait donc, ce qui fut établi par la suite, que l'acide hexuronique devait présenter une activité légèrement supérieure. Le résultat de l'expérience et la correction faite sur l'activité de l'échantillon de SZENT GYÖRGYI paraissait démontrer que l'activité antiscorbutique du jus de citron était proportionnelle à la quantité d'acide hexuronique qu'on pouvait en extraire. Mais, le pouvoir antiscorbutique de la préparation de SZENT GYÖRGYI pouvait encore être dû à une substance très active qu'on n'aurait pu éliminer. ZILVA, pour les raisons que nous avons indiquées plus haut, combattit l'hypothèse de l'identité de la vitamine C et de l'acide hexuronique; mais de nombreux savants vinrent bientôt confirmer les résultats de SZENT GYÖRGYI. ZILVA lui-même, plus tard, se rallia à cette thèse. Les premières confirmations sont

fournies par BIRCH, HARRIS, RAY, MILLS et INNES (1932-1933). KING, par un procédé différent de celui de SZENT GYÖRGYI isole, en partant du jus de citron, une substance dont les propriétés antiscorbutiques, physiques et chimiques sont les mêmes que celle de l'acide hexuronique.

On dosa par l'emploi des méthodes curative, préventive et de celle de Höjer, basée sur les modifications de la structure des dents d'un cobaye carencé, le pouvoir antiscorbutique de diverses substances. Le pouvoir de la corticosurrénale est déterminé par HARRIS et RAY, qui utilisent la méthode curative. Ils le trouvent égal à trois fois celui du jus d'orange.

On constate bientôt que la vitamine C a la même répartition dans la nature que l'acide hexuronique.

Toutes les substances qui manifestent des propriétés antiscorbutiques possèdent de l'acide hexuronique.

Chez un animal sensible au scorbut, par exemple le cobaye, la disparition de l'acide hexuronique dans la glande surrénale correspond à la diminution de l'activité antiscorbutique, lorsque l'animal est nourri sans vitamine. Le rat et le lapin, au contraire, peuvent réaliser la synthèse de la vitamine C. L'acide hexuronique ne disparaît pas de leur glande dans un régime dépourvu de vitamine C.

L'acide hexuronique a un pouvoir constant quelle que soit son origine; la quantité d'acide hexuronique retirée des glandes surrénales a la même activité que celle obtenue des sources végétales.

Dans les tissus les plus différents tant chez les animaux que chez les végétaux, l'activité marche parallèlement au taux d'acide hexuronique; la mesure étant faite par des procédés chimiques (avec les oxydants) ou par l'absorption de la lumière à une longueur d'onde à laquelle l'acide montre une absorption spécifique.

La vitamine C suit de près l'acide hexuronique dans les réactions les plus variées.

Si l'acide est détruit en partie par des agents chimiques, le taux d'acide conservé et l'activité antiscorbutique sont toujours parallèles.

La destruction de l'acide hexuronique, par aération, par la chaleur ou les alcalis est suivie d'une destruction semblable de l'activité antiscorbutique.

Après cinq recristallisations, l'acide ne perd pas de son pouvoir antiscorbutique.

Les démonstrations ainsi énumérées paraîtraient suffisantes pour prouver l'identité des deux substances. Dans toutes ces épreuves, si l'un des corps avait manifesté une propriété différente, elle se serait trahie. On pouvait encore objecter que l'activité observée n'était pas celle de l'acide, mais d'une substance très active qu'il aurait renfermée dans ses cristaux. Seule la méthode chimique pouvait sur ce point apporter les données les plus rigoureuses. Pour opérer par ce moyen, il était nécessaire de disposer de grandes quantités d'acide hexuronique. Les fruits en contenaient trop peu pour pouvoir être utilisés et la glande surrénale coûtait trop chère et n'était pas assez riche en ce constituant. Il fallait, en effet, uti-

liser des milliers de kilogrammes de glandes pour obtenir 20 gr. d'acide hexuronique, quantité encore insuffisante pour procéder à des essais importants.

L'attention de SZENT GYÖRGYI fut attirée par les particularités d'une plante, le « *Capsicum annuum* », variété de paprika, appelée encore piment rouge ou poivron. Cette plante était cultivée autour de Szeged, en Hongrie. Ses fruits contenaient de la vitamine C en quantité non seulement surprenante, mais ils offraient en outre l'avantage de la renfermer dans un milieu cellulaire qui rendait facile son isolement. Le paprika avait à poids égal une teneur en vitamine C quatre fois supérieure à celle de l'orange, qui est pourtant particulièrement riche en cette vitamine. 2.000 kg. de paprika permettaient de préparer en quelques semaines 500 gr. de vitamine C pure et cristallisée. On pouvait ainsi poursuivre l'étude chimique de ce corps. En collaboration avec VARGA (1932), SZENT GYÖRGYI chercha un dérivé qui puisse faciliter les travaux. Les dérivés acétylés et benzoylés ne convenaient pas; ils ne pouvaient être obtenus à l'état cristallisé. Le dérivé cétonique réunissait toutes les conditions désirables. Il cristallisait en grands prismes et bouilli en solution aqueuse, il se décomposait en acétone et en acide hexuronique. Il est impossible de supposer qu'au cours de ces manipulations une substance étrangère ait accompagné la vitamine C. Le produit régénéré conservait ses propriétés antiscorbutiques, et il ne pouvait donc subsister aucun doute sur l'identité de l'acide et de la vitamine C. Le dérivé monocétonique était un peu actif par suite

de son hydrolyse partielle, mais son pouvoir n'était pas comparable à celui de l'acide hexuronique. Ainsi, toutes les preuves de l'identité des deux facteurs étaient telles maintenant établies. SZENT GYÖRGYI avait déjà remplacé, avant cette expérience, le nom d'acide hexuronique par celui d'acide ascorbique.

Il sera désormais employé sur la référence de son caractère spécifique indiscutable.

CHAPITRE III

LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES ET LA CONSTITUTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

L'étude des propriétés de l'acide ascorbique, commencée par SZENT GYÖRGYI et SVIRBELY, a été précisée par HIRST, REYNOLDS et HAWORTH au laboratoire de Birmingham. La découverte de sa structure a permis de réaliser rapidement sa synthèse. L'acide synthétique l. ascorbique a la même activité biologique que l'acide ascorbique extrait du paprika. Il fond à 192° ; son pouvoir rotatoire est de $(\alpha) D/20^{\circ} = 20^{\circ}0$ dans l'eau, la concentration étant de 14 gr. %. Il cristallise en plaques rectangulaires; sa réfringence est très élevée. Le spectre d'absorption en solution légèrement acide est caractérisé par une bande unique intense, avec un maximum à $D = 245 \text{ m. } \mu$. L'activité de l'acide dextrogyre, au contraire, est très faible.

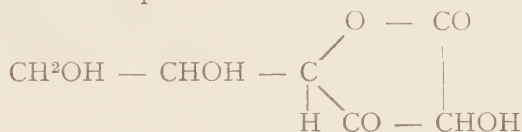
L'acide ascorbique est très soluble dans l'eau et l'alcool méthylique; soluble à un degré moindre dans l'alcool éthylique et l'acétone; légèrement soluble

dans l'alcool butylique; il est insoluble dans l'éther ou l'éther de pétrole. De ses solutions alcooliques il n'est pas précipité dans l'éther, mais il l'est, au contraire, par l'éther de pétrole. Les sels de sodium ou d'ammonium sont solubles dans l'eau, le sel de baryum l'est un peu moins. L'acétate de plomb normal donne des sels complexes, solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool. L'acétate basique de plomb donne des sels insolubles dans l'eau et dans l'alcool. Cette insolubilité des sels de plomb en solution alcoolique, même en milieu acide, est mise à profit dans la préparation. Mais la précipitation, en milieu acide, n'a pas lieu avec le jus brut. Elle devient possible si elle a été précédée d'une précipitation par l'acétate basique de plomb. D'après SZENT GYÖGYI, le jus brut renfermerait un facteur inhibiteur de la précipitation par l'acétate basique de plomb en milieu acide. En solution aqueuse et en l'absence d'oxygène, l'acide ascorbique est stable. Il n'est pas détruit par une ébullition rapide et peut être mis en présence d'acides minéraux dilués. Au contraire, dans les solvants anhydres (alcool, acétone), il est très sensible à l'action des acides minéraux. L'oxydation par l'oxygène moléculaire n'est pas réversible: elle est destructrice. L'acide ascorbique ne fermente pas en présence de la levure. Il réduit, à la température ordinaire, la liqueur de Fehling, le nitrate d'argent alcalin ou neutre et le permanganate de K. Il donne la réaction de Molisch (coloration pourpre avec l' α naphthol et l'acide sulfurique) et la réaction de l'orcine.

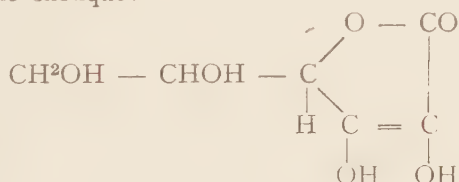
La composition de l'acide ascorbique est $C^6H^8O^6$ et son poids moléculaire 176. SZENT GYÖRGYI avait pensé que c'était l'anhydride d'un acide hexose uronique. Mais les recherches de MICHEEL et KRAFT, EULER et MARTIUS, COX, HIRST et REYNOLDS ont montré qu'il possédait une structure différente.

Voici, d'après HAWORTH et ses collaborateurs, les formules de l'acide ascorbique et de son produit d'oxydation réversible.

1° Acide ascorbique :



2° Forme érolique :



3° Produit d'oxydation réversible ou acide dehydroascorbique ($C^6H^6O^6$) :



« L'acide ascorbique est un dérivé de l'acide oxy-tétronique, c'est-à-dire d'un furfurane possédant une fonction diénolique analogue à celle qui est présente dans l'orthodiphénol ».

Il s'obtient par synthèse en faisant agir CNH sur l'ozonide du xylose $C^5O^5H^8$ (REICHSTEIN, GRUSSNER, HAWORTH, HIRST).

L'éthérification des deux OH énoliques donne l'acide diméthylascorbique (F 63°), totalement inactif. L'acide cétone ascorbique possède une certaine activité due, on suppose, à son hydrolyse lente dans l'organisme. L'acide d erythro-3-cétohexuronique est actif, mais 20 fois moins que l'acide ascorbique.

CHAPITRE IV

ACTION DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES. ET CHIMIQUES SUR LE POUVOIR ANTISCORBUTIQUE

Actif dans les milieux vivants, le facteur C perd son pouvoir au cours de leur altération. Une feuille détachée de sa tige dépérit et son activité antiscorbutique diminue rapidement. La vitamine C est indissolublement liée à l'élément de vie. La conservation, le vieillissement, la dessiccation, la chaleur tendent à atténuer et à faire disparaître le pouvoir antiscorbutique des jus de fruit.

1° Les végétaux exposés à l'air perdent leur activité.

2° L'action des agents nuisibles est plus intense et plus rapide sur les jus extraits des plantes que sur les végétaux conservés intacts.

3° Cette action est variable suivant les espèces végétales considérées.

4° Les végétaux à réaction acide (tomate, groseille), certains jus acides (citron, orange) résistent plus

facilement à l'action de la chaleur et de la température.

En 1920, BEZSSONOFF a montré que pour les végétaux non acides, le broyage diminue le pouvoir antiscorbutique et que leur faible propriété est attribuée à l'action des diastases oxydantes présentes dès l'obtention des jus. En paralysant l'action des enzymes par l'acide tartrique ou citrique à faible concentration, il a pu obtenir, après broyage des pommes de terre, un jus acidulé gardant la majeure partie de ses propriétés. Le facteur réducteur est détruit plus facilement en solution alcaline en présence de l'air qu'en solution acide.

Le PH a une grande influence sur la destruction du pouvoir antiscorbutique par la chaleur et par le temps. A une température de 100° , pendant une heure, lorsque le PH est relativement bas (5), la perte du pouvoir antiscorbutique du jus de citron est de 58 % et, lorsque sa valeur s'élève, la perte devient plus importante. A la température ordinaire, quand le PH est égal à 10, la destruction est presque totale au bout de cinq jours, tandis que le jus ordinaire ne perd que 50 % de son pouvoir en six mois.

Le pouvoir du PH sur l'action de l'air est également important. ZILVA a montré qu'un courant d'air traversant du jus de citron à 100° et à un PH égal à 2,2 n'agissait que très lentement sur son activité, tandis qu'elle diminuait de 33 % au bout de 30 minutes lorsque le jus décitraté à un PH égal à 12,5 était au contact de l'air.

TABLEAU DÉMONSTRANT L'EFFET DE LA CHALEUR,
DE L'AÉRATION ET DU PH
SUR LA DESTRUCTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE
(HARRIS et RAY)

	Pourcentage de l'acide ascorbique resté intact
Jus d'orange frais	100
Jus d'orange bouilli pendant deux heures.....	34
Jus d'orange exposé à l'air pendant deux heures.	79
Jus d'orange non chauffé	100
Jus d'orange chauffé au bain-marie pendant une heure	60
Jus d'orange chauffé au bain-marie pendant deux heures	30
Solution d'acide ascorbique PH 3,4	100
Solution d'acide ascorbique chauffée pendant une demi-heure	82,8
Solution d'acide ascorbique chauffée pendant une heure	82,8
Solution d'acide ascorbique PH 4,5	100
Solution d'acide ascorbique chauffée pendant une heure	16,5
Solution d'acide ascorbique chauffée pendant deux heures	0
Solution d'acide ascorbique non exposée à l'air..	100
Solution d'acide ascorbique exposée quinze mi- nutes à l'air	9
Solution d'acide ascorbique en solution alcaline au bout de trente minutes	0

Oxydation

L'action de l'air détruit la vitamine C, ainsi que l'expérience de Rossi, en 1918, nous en fournit l'exemple. Du foin frais, chauffé à l'autoclave à 126° pendant une heure garde ses propriétés s'il est renfermé dans des récipients hermétiquement clos, tandis qu'il les perd s'il est mis dans des récipients ouverts. En opérant à l'abri de l'air, on a réussi à dessécher du jus de citron, d'orange, de chou, ainsi que du lait, sans faire disparaître leur action antiscorbutique. L'activité de la vitamine est conservée en solution alcaline en l'absence de l'air. En outre, on sait que la destruction de la vitamine C se traduit par une perte du pouvoir réducteur. HIRST a montré qu'il y avait une relation entre le pouvoir antiscorbutique de plusieurs échantillons d'acide ascorbique et leur capacité réductrice mesurée par le dichlorophénol indophénol. Parallèlement à la diminution du pouvoir réducteur et à celle de l'activité antiscorbutique, l'oxydation détermine le brunissement des jus de fruits. Les fruits exposés à l'air perdent leur vitamine C; le jus prend une coloration brune qui s'accroît au cours de la dessiccation et de la conservation. L'intensité de la teinte va de pair avec la diminution du pouvoir réducteur mesuré à l'iode et au dichlorophénolindophénol. Il est probable que ce fait est dû à la décomposition de l'acide ascorbique ou, comme HIRST et ZILVA le pensent, à la formation d'une substance brune amorphe, issue de ce même acide.

Action de la température

Il faut une longue ébullition suivie d'une dessiccation pour diminuer sensiblement la valeur antiscorbutique du chou, de la pomme de terre et de la carotte.

L'ébullition, en présence du gaz carbonique ou de l'azote, n'a aucune action. L'ébullition du jus d'orange ou de citron avec un réfrigérant ascendant, pendant plusieurs heures, ne produit qu'une petite diminution du pouvoir réducteur.

Effet de la pasteurisation sur le jus de citron

BENNETT et TARBERT ont réalisé l'expérience suivante: du jus de citron contenu dans une série de tubes étaient chauffé à 65° pendant une heure. Les tubes étaient bouchés avec du coton.

La quantité d'acide ascorbique était représentée en centimètres cubes par la mesure du pouvoir réducteur de 1 cm³ de jus de citron, obtenue au moyen d'une solution N/1000 de dichlorophénolindophénol.

Dosage initial	8 cc.
Immédiatement après la pasteurisation.....	7 cc. 5
Après 16 heures	7 cc. 2
Après 2 jours	6 cc. 8
Après 4 jours	5 cc. 1
Après 6 jours	4 cc. 7
Après 8 jours	3 cc. 5
Après 11 jours	3 cc. 1
Après 13 jours	2 cc. 2
Après 18 jours	—

La diminution du pouvoir réducteur est régulière; le pouvoir antiscorbutique disparaît au bout de 18 jours.

En général, le pouvoir antiscorbutique du jus d'orange et de citron se conserve longtemps. D'après BACHARACH, COOK et SMITH, au bout d'un mois la teneur de l'orange en acide ascorbique serait abaissée de 20 % et celle du citron de 6 %.

La concentration des jus de fruits ne diminue pas leur titre en acide ascorbique et ne modifie pas leur activité biologique. La quantité d'acide ascorbique est encore très élevée au moment de l'apparition des moisissures et pendant la fermentation des jus. La fermentation semblerait avoir un rôle très important. Elle faciliterait la conservation de la vitamine C. Tous les facteurs qui gênent ou empêchent la fermentation déterminent une diminution régulière et rapide de l'activité antiscorbutique. Dans tous les jus non fermentés, le facteur réducteur est pratiquement disparu au bout de 30 jours.

Effet des acides sur la fermentation

	Dosage initial	18 heures	8 jours	15 jours
	—	—	—	—
90 cc. de jus de citron + 1 cc.				
HCl... PH 1,8	8,75	7,8	1,4	—
90 cc. de jus de citron + 5 cc.				
HCl... PH 1,2	8,3	7,2	0,9	—

Le pouvoir réducteur est supprimé en moins d'une semaine, l'acidité étant trop forte pour qu'il y ait fermentation.

Action de l'alcool

L'alcool également détermine une perte rapide de l'activité antiscorbutique.

	Titrage initial	3 jours	8 jours	16 jours	37 jours
Jus de citron contenant 10 % d'alcool	8,5	6,9	5,0	1,1	—
Jus de citron contenant 50 % d'alcool	Tout le pouvoir réducteur est perdu en 5 jours.				

*Action des antiseptiques, et autres substances
empêchant la fermentation*

	Dosage initial	2 jours	7 jours	30 jours	95 jours
Sans antiseptique	7,80	7,50	7,50	7,35	6,90
SO ² 0,035 %	7,80	7,40	6,90	0,60	—
Acide benzoïque 0,063 %.	7,80	6,30	5,60	0,50	—
Fluorure de Na 0,10 %..	7,80	5,80	2,20	0,30	—
Acide formique 0,30 %..	7,80	5,60	2	—	—
Formol 0,30 %	7,80	0,50	—	—	—
Acide salicylique 0,05 %.	7,80	6,20	3,20	0,50	—
Glucose 40 %	3,90	3,60	3,60	3,50	—
Saccharose 40 %	3,90	3,75	3,75	3,60	—

Parmi les antiseptiques SO^2 conserve le plus longtemps le pouvoir du jus de citron, mais celui-ci disparaît au bout de 30 à 40 jours.

Effet de traces de métal

	Dosage initial	24 heures	96 heures	5 jours	12 jours	28 jours
	—	—	—	—	—	—
Jus de citron + 0,001 %						
de cuivre.....	8,00	6,5	5,6	5,6	5,6	5,6
Jus de citron + 0,003 %						
de cuivre.....	8,00	6,2	4,3	—	—	4,3
Jus de citron + 0,001 %						
de fer.....	8,00	7,8	7,8	7,8	7,8	7,7
Jus de citron + 0,001 %						
d'aluminium.....	8,00	7,8	7,8	7,8	7,8	7,7

Le fer et l'aluminium n'ont aucun effet. Le cuivre produit une diminution un peu rapide, mais il n'a plus d'action lorsque la fermentation a lieu.

Effet de l'essence de citron

Cette essence très peu soluble forme à la surface du jus une couche protectrice plus ou moins épaisse; elle empêche la formation des moisissures, mais n'a aucune action sur la fermentation. Ainsi, les substances qui évitent la fermentation auraient une grande action destructive sur la vitamine C. Les anti-

septiques, excepté le formol qui le détruit immédiatement, n'attaqueraient pas l'acide ascorbique, mais empêcheraient l'action d'un facteur qui protège la vitamine de l'oxydation en présence de l'air. Ce facteur, détruit par la chaleur et les antiseptiques et conservé si la fermentation se déclenche, doit être de la nature d'une enzyme.

La vitamine est donc particulièrement instable dans les conditions défavorables au développement des moisissures et également des bactéries.

Le jus d'orange a les mêmes propriétés que le jus de citron, mais il résisterait mieux à l'action de SO^2 .

D'après FUNK, le pouvoir antiscorbutique est détruit par le radium; les rayons ultra-violets n'auraient d'influence que parce qu'ils déterminent la production d'ozone. La filtration sur bougie semble détruire en partie la vitamine C.

CHAPITRE V

EXTRACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

*Schéma simplifié de la préparation de la vitamine C,
en partant des grandes surrénales et du jus d'orange*
(L. RANDOIN et M.-R. NETTER)

Surrénales.	Jus d'orange.
Addition d'alcool méthylique et d'une petite quantité d'un cyanure alcalin.	Addition d' NH_3 et d'une pe- tite quantité d'un cyanure alcalin.

Addition d'acétate de Ba

Solution.	Précipité.
Concentration.	
Addition d'acétate de Pb et d' NH_3 (préci- pitation en milieu légèrement alcalin).	

Précipité.	Solution.
Décomposition par SO_4H_2 ($\text{pH} = 6$).	

Solution.	Précipité.
Concentration.	
Addition d'alcool à 96°.	
Addition d'acétate de Pb saturé (précipi- tation en milieu légèrement acide).	

Précipité mis en suspension dans l'acétone.	Solution.
Décomposition par H^2S .	

Solution acétonique.	Précipité.
Evaporation.	
Addition d'éther ou d'éther de pétrole.	

Précipité huileux.	Solution.
Dessiccation. Refroidissement à la glacière.	
L'acide ascorbique cristallise.	
Purification: addition d'éther ou d'éther de pétrole à la solution méthylque.	

*Préparation de l'acide ascorbique
en partant du Capsicum annuum*

50 kg. de fruits de paprika privés de cœur sont hachés. On ajoute une solution saturée d'acétate de baryum; on laisse en contact une heure et l'on exprime à la presse, obtenant ainsi quarante litres de jus. En l'absence de l'air ce jus reste stable pendant deux à trois semaines. On le décante.

Solution.	Précipité.
Addition d'acétate de Pb jusqu'à légère alcalinité avec NH^3 en présence de bleu de bromothymol. Centrifuge.	

Précipité mis en suspension dans une petite quantité d'eau.	Solution.
Addition d' SO^4H^2 jusqu'à coloration légèrement rouge.	
Centrifuge.	

Solution.	Précipité.
Addition d'acétate de Ba.	
Centrifuge.	

Solution.	Précipité.
Addition d'acétate de Pb	
Liquide ne doit plus précipiter à $P_H = 8,5$	
par addition d'un excès de Pb. Alcalin au	
bleu de bromothymol.	

Précipité (traité comme plus haut). SO^4H^2 .	Solution.
---	-----------

Solution.	Précipité.
Addition d' NH^3 jusqu'à virage du bleu de	
bromothymol.	
Evaporation « in vacuo » jusqu'à consis-	
tance sirupeuse. Addition d'alcool méthy-	
lique.	

Solution.	Précipité à peu près inactif
	séparé sur un filtre de
	Büchner.
	Addition d'acétone.

Solution.	Précipité ré-
	sineux.
	Addition d'al-
	cool méthy-
	lique et
	d'acétone.

Solution.

On mélange les 3 solutions

Mélange

Concentration dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse.
Addition d'alcool méthylique et d'acétone.

Solution.	Précipité.
	Addition d'alcool méthylique et d'acétone.

Solution.	Précipité.
-----------	------------

Mélange

Addition d'éther éthylique anhydre.

Solution.	Résidu sirupeux.
	Addition d'alcool méthylique, d'acétone et d'éther.

Solution.	Précipité.
-----------	------------

Mélange

Concentration dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse.

Le sirop est versé dans un cristalloir, séché dans le vide sur de l'acide sulfurique, en mettant de la soude granulée dans le dessicateur. L'acide ascorbique cristallise. On lave les cristaux avec une petite quantité d'alcool méthylique; on les rassemble dans un filtre de Büchner. Ils sont lavés ensuite avec de l'acétone et séchés dans le vide.

La préparation arrivée à ce stade demande trois jours.

La liqueur-mère est traitée, une fois de plus, par un excès d'acétone et d'éther, comme on l'a déjà indiqué, et une deuxième cristallisation a lieu.

Recristallisation

Les cristaux sont dissous à une douce chaleur, dans un mélange d'alcool méthylique et de dioxane. On évapore à un faible volume et on refroidit à la glacière. Les cristaux sont lavés avec de l'acétone et séchés dans le vide sur de l'acide sulfurique. En partant de la liqueur-mère, par une autre concentration, on peut obtenir une plus grande quantité de cristaux. La recristallisation peut être effectuée avec peu de perte.

Préparation du dérivé monocétonique

On dissout l'acide ascorbique dans l'acétone en présence de sulfate de cuivre anhydre. On filtre au bout de 24 heures. On évapore jusqu'au tiers du volume primitif et on ajoute à la solution concentrée deux fois son volume d'éther de pétrole. Le dérivé monocétonique cristallise en prismes incolores. On le redissout dans l'acétone et le cristallise à nouveau par addition d'éther de pétrole. Le dérivé monocétonique est lentement décomposé dans l'eau froide et rapidement dans l'eau chaude. La solution aqueuse récente, évaporée dans le vide, donne des cristaux d'acide ascorbique.

QUATRIÈME PARTIE

LE DOSAGE DE LA VITAMINE C

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES DE DOSAGE DE LA VITAMINE C

Les méthodes de dosage de l'acide ascorbique sont relativement nombreuses; elles sont basées sur l'utilisation des propriétés biologiques, physiques et chimiques de cet acide.

a) MÉTHODES BIOLOGIQUES

Le dosage biologique, qui conserve une valeur constante et absolue dans ses résultats, sert de contrôle aux méthodes chimiques. Il s'appuie sur l'examen des troubles produits dans un organisme par une déficience plus ou moins grande en vitamine C, troubles s'aggravant jusqu'au point de provoquer la mort de l'animal soumis à l'expérience.

Pour caractériser la vitamine C, on expérimente avec un régime type, un régime standard, adapté d'une manière aussi parfaite que possible à l'animal réactif qui doit le consommer. Celui-ci doit être très sensible au défaut de la vitamine que l'on veut étudier. On s'est servi, dans ce cas, du cobaye.

Pour chaque essai, les sujets doivent avoir le même poids, le même âge et avoir été soumis préalablement à un régime normal. Le régime type ou scorbutigène ne doit pas contenir la moindre trace de vitamine C. Les régimes sont constitués par des substances purifiées et d'une composition chimique bien connue. On les appelle, pour cette raison, des régimes artificiels. Ils sont biochimiquement équilibrés et contiennent deux parties: l'une, la plus importante par rapport au volume, est formée de substances énergétiques purifiées (albuminoïdes ou protides, graisses ou lipides, hydrates de carbone ou glucides) et de substances élémentaires fondamentales (éléments minéraux, acides aminés et vitamines à l'exception de la vitamine C). La seconde partie, minime au point de vue pondéral, est formée d'une substance étalon riche en vitamine C (jus de citron, jus d'orange, etc...), mais depuis la découverte de la vitamine C, on tend à lui substituer une solution titrée d'acide ascorbique dont le pouvoir est moins susceptible de varier. La dose adoptée, aussi bien pour les jus de fruits et les sucres de plantes que pour la solution de vitamine C est celle qui administrée journellement, assure l'entretien de la vie et même l'augmentation du poids chez le cobaye jeune. C'est la dose quotidienne minimum.

Pour l'expérimentation, on dispose les cobayes en trois lots. L'un soumis au régime artificiel complet, c'est-à-dire comprenant, en plus de ses substances énergétiques et élémentaires, une dose minimum de vitamine C capable de préserver le cobaye du scorbut; un deuxième lot ou lot témoin, soumis au régime arti-

ficiel privé de vitamine C; enfin, un troisième, dans lequel on fait varier la quantité d'une substance riche en vitamine C, d'origine animale ou végétale ou encore une solution d'acide ascorbique dont on veut contrôler le titre.

Le titrage se fait par trois méthodes :

La méthode préventive, qui consiste à déterminer la dose quotidienne minimum capable d'empêcher l'apparition des symptômes scorbutiques.

La méthode curative, qui repose sur l'évaluation de la quantité minimum nécessaire pour constater la guérison d'un animal soumis au régime carencé en facteur C.

Quant à la troisième méthode, elle revêt un caractère particulier; elle utilise les modifications apportées dans les tissus des dents chez un animal scorbutique. C'est une transposition sur un plan histochemique et sur un terrain nettement circonscrit de la méthode biologique générale.

*Méthode fondée sur la modification
de la structure des dents*

(Méthode de HÖJER modifiée par KEY et ELPHICK)

ZILVA et WELLS (1919), HÖJER (1924 et 1926), GOETSCH (1928) ont montré qu'il se produit des modifications dans les dents des animaux soumis à un régime scorbutigène. HÖJER a décrit dix stades représentant diverses périodes dans le développement du scorbut. D'après lui, chaque stade correspondait

à une fraction de la quantité minimum de vitamine C nécessaire pour assurer la vie du cobaye. ELPHICK pensa que si, comme HÖJER l'indiquait, il était possible de trouver une relation entre la dose préventive et une dose déterminée, cette méthode permettrait de mesurer le pouvoir antiscorbutique de toutes les substances étudiées.

Son expérience fut la suivante: Il disposa des cobayes en plusieurs lots. L'un était soumis au régime scorbutigène strict; les autres recevaient respectivement 0 cm³ 75, 1 cm³ 5 et 3 cm³ de jus de citron. Au bout de 14 jours, on tuait les animaux et on procédait à un examen général des lésions. ELPHICK et KEY remarquèrent que les symptômes de scorbut étaient déjà accusés chez les cobayes soumis au régime de base. Chez les autres, ils étaient difficilement décelables.

La différence de l'intensité des lésions était grande entre les animaux soumis au régime carencé et ceux qui avaient reçu du jus de citron. Par contre, elle était moins apparente dans les divers lots qui avaient bénéficié de doses croissantes de vitamine C. Seule l'étude de la structure des dents permettait de distinguer nettement l'effet des différentes doses de jus de citron.

ELPHICK a décrit cinq aspects de la structure des dents correspondant aux divers degrés du scorbut, allant de l'état aigu à l'état normal.

Aspect de la section transversale

d'une racine d'incisive normale chez un jeune cobaye

On fait une coupe transversale au niveau de la racine d'une incisive. De la partie centrale à la périphérie, on rencontre les zones de tissus suivantes: Au centre, la pulpe, puis, successivement, les odontoblastes, cellules allongées et parallèles, et la dentine ou ivoire. La dentine est elle-même précédée d'une étroite prédentine, localisée, entre son bord interne et la face externe des odontoblastes. La dentine est creusée d'un certain nombre de tubes calcifiés appelés canalicules de Tomes dans lesquels pénètrent les fibres de Tomes, issues des odontoblastes. Le ciment ne se forme que plus tard.

Aspect de la section transversale

d'une racine d'incisive

provenant d'un cobaye scorbutique

Chez un cobaye atteint de scorbut on reconnaît dans la racine des incisives les modifications suivantes: Les odontoblastes sont désorganisés, la prédentine est calcifiée et une couche osseuse irrégulière se forme entre elle et les odontoblastes. Nous l'appellerons, selon l'expression d'ELPHICK (inner dentine), couche interne de la dentine. C'est, par conséquent une formation pathologique.

Les canalicules de Tomes sont raccourcis et deviennent peu nombreux. On ne les aperçoit plus que dans la partie externe de la dentine, alors qu'à l'état nor-

mal ils s'étendent, en partant de la face externe des odontoblastes, sur toute la largeur de la prédentine et de la dentine.

Groupe O. — Les cobayes de ce groupe avaient été soumis uniquement au régime scorbutigène. Les modifications observées dans les tissus de la racine des incisives étaient les suivantes, toutes les coupes étant faites en section transversale au niveau de cet élément :

Les odontoblastes sont complètement désorganisés.

La couche interne de la dentine atteint une largeur égale à environ le tiers de la dentine. Elle envoie des prolongements dans la pulpe et, par endroits, en isole quelques petites parties. La prédentine est calcifiée. Les canalicules de Tomes sont limitées à la partie externe de la dentine.

Groupe I. — Dans ce groupe, les odontoblastes sont parallèles mais courts; ils ne sont désorganisés que dans certaines parties de la section et près de la pulpe. La couche interne de la dentine est plus étroite que dans le groupe précédent; elle est irrégulière dans le voisinage des odontoblastes et ne prolifère pas dans la pulpe. La prédentine est calcifiée. Un petit nombre de canalicules sont visibles dans la partie interne de la dentine.

Groupe II. — Les odontoblastes sont parallèles, courts et désorganisés près de la pulpe. La couche interne de la dentine est étroite et irrégulière; la prédentine est calcifiée complètement ou partiellement.

Quelques canalicules de Tomes pénètrent dans la couche interne de la dentine.

Groupe III. — Les animaux de ce groupe sont seulement atteints de scorbut léger. Les odontoblastes sont longs et parallèles, désagrégés vers la pulpe, mais conservent encore dans cette région leur disposition normale. La couche interne de la dentine a complètement disparu ou n'est plus représentée que par une simple ligne. Les canalicules de Tomes occupent toute la largeur de la prédentine et de la dentine.

Groupe IV. — Les animaux de ce groupe sont totalement protégés du scorbut. Les dents sont normales : les odontoblastes sont longs et parallèles ; la couche interne de la dentine n'existe plus ; la prédentine n'est plus calcifiée et les canalicules de Tomes rayonnent sur toute la largeur de la dentine.

Presque toutes les dents examinées correspondent à un de ces cinq groupes. Cependant, on a trouvé sur une section une zone caractérisant le groupe O et une autre le groupe 3 ou 4. Par exemple, une couche interne de la dentine large et des odontoblastes longs et parallèles, seulement désorganisés près de la pulpe, coexistaient sur une même coupe.

Pour déterminer le degré de scorbut on établissait une valeur moyenne. ELPHICK et KEY observèrent dans deux dents une dentine présentant deux à trois anneaux calcifiés (structure dont on n'a pu expliquer la raison).

La dentine est large dans une dent normale et comparativement étroite dans une dent d'animal scorbutique, mais ce caractère ne saurait servir de critérium pour évaluer le degré du scorbut, sa largeur dépendant principalement de la position exacte de la section transversale. Notons également la nécessité d'opérer sur un très grand nombre d'animaux pour éviter les erreurs dues à la résistance particulière de certains.

La méthode de Höjer, modifiée par KEY et ELPHICK, consiste donc à déterminer la dose minimum d'une substance nécessaire pour éviter l'apparition des signes de scorbut dans les dents.

On compare les résultats avec ceux d'un lot témoin de cobayes auxquels on administre une dose standard de jus de citron, permettant la conservation de la structure normale des dents. On tue les animaux au bout de 14 jours et l'on procède à l'examen.

La méthode de Höjer a été souvent employée pour l'évaluation du pouvoir antiscorbutique de nombreuses substances. Actuellement, elle est encore fréquemment utilisée au même titre que les méthodes curatives et préventives et sert de contrôle aux dosages chimiques.

b) MÉTHODE PHYSIQUE

La titration peut être effectuée par le degré d'absorption de la raie 265μ . L'acide ascorbique montre, en effet, pour cette longueur d'onde une absorption spécifique. Mais selon BEZSSONOFF, l'absorption dans l'ultra violet ne se conformant pas à la loi de Beer,

le dosage par le procédé spectrophotométrique est difficile à réaliser.

c) MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES ET CHIMIQUES

En 1916, EDDY essaya d'employer le réactif des phénols Folin-Denis, mélange de tungstate de soude et d'acide phosphorique, pour titrer le facteur B ou principe antibériberique. Pensant l'utiliser pour le dosage de la vitamine C, qui paraissait posséder un groupement phénolique, BEZSSONOFF le modifia en acide monomolybdophosphotungstique de formule $\text{MoO}_3 \cdot 17(\text{TuO}^3) \cdot \text{P}^2\text{O}^5 \cdot 24\text{H}^2\text{O}$. Cet acide se présente sous la forme de cristaux brillants, jaune pâle, appartenant au système monoclinique uniforme. On l'utilise dissous dans une solution d'acide sulfurique. C'est le réactif des Polyphénols et des Vitamines, mais les conditions dans lesquelles se produit la coloration violette qu'il donne en présence de la vitamine C en font l'indicateur spécifique de cette dernière. La même coloration ne se produit qu'avec le réductone, l'ortho et le para diphénol et certains de leurs dérivés.

La découverte de la structure de l'acide ascorbique a montré que le réactif de Bezssonoff caractérisait la présence dans la molécule d'une fonction diénolique réductrice — $\text{COH} = \text{COH}$ —.

C'est elle qui provoque la réaction violette et qui décolore les phénols indophénols. Les propriétés réductrices de l'acide ascorbique lui sont nécessaires pour exercer l'action antiscorbutique. En effet, celle-

ci disparaît quand la molécule soumise à la méthylation perd son pouvoir réducteur. Cependant certains corps, le réductone de Euler, certains dérivés de la vitamine C, l'acide monoacétone ascorbique possédant un groupe réducteur, n'ont aucune action antiscorbutique.

Lorsqu'on ajoute un phénol-indophénol jusqu'à l'obtention d'une teinte faible, à un liquide antiscorbutique, il se produit dans le milieu une première forme d'oxydation réversible de l'acide ascorbique ou un acide déhydroascorbique ($C^6H^6O^6$). Ce corps ne possède pas les mêmes propriétés réductrices que la vitamine C, mais conserve son pouvoir antiscorbutique. Il est aussi particulièrement labile. Conservé à l'air, en solution aqueuse, à la température ordinaire, il s'oxyde avec une vitesse qui dépasse celle de sa retransformation en acide ascorbique. L'acide ascorbique forme, avec ses produits d'oxydation, un système réversible complexe. Ainsi que l'a précisé BEZSSONOFF: « La réduction-oxydation du phénol-indophénol au sein du liquide antiscorbutique correspond à une oxydo-réduction de la vitamine C » qui s'exprime de la manière suivante:

Phénol-indophénol $\rightleftharpoons$ leucobase et acide ascorbique $\rightleftharpoons$ forme oxydée active.

D'autres facteurs antiscorbutiques sont représentés par l'acide oxytétronique, les isomères de l'acide ascorbique naturel (REICHSTEIN) et ses éthers hydrolysables par le suc gastrique.

Les indices du groupe réducteur de la vitamine C

BEZSSONOFF pense que « l'oxydation réduction des indicateurs étant réversible, ceux-ci ne peuvent permettre le dosage direct de la vitamine C, car la même quantité d'un réducteur utilisé à des concentrations différentes décolore des quantités différentes d'indicateur ».

Une autre cause d'erreur est produite par la présence d'agents réducteurs autres que la vitamine C. Mais, au contraire, pour qu'un corps favorise la réaction violette, « il ne lui suffit pas de posséder un certain potentiel d'oxydo-réduction; il doit, en outre, avoir une structure déterminée ». La réaction de Bezssonoff « a un caractère chimique défini et correspond à une oxydo-réduction irréversible ». Si la détermination du potentiel d'oxydo-réduction est insuffisante pour la caractérisation de la vitamine C, couplée avec l'épreuve au réactif de Bezssonoff, elle permet de la distinguer parmi d'autres réducteurs à fonction diénolique.

Identification de la vitamine C dans les milieux biologiques

On identifie et dose la vitamine C à l'aide d'une méthode basée sur ses particularités chimiques et ses propriétés réductrices. On détermine par la réaction violette, en se servant de solution d'hydroquinone comme étalon, la concentration moléculaire du réducteur diénolique. On mesure, ensuite, en opérant à des concentrations différentes, à l'aide d'indicateurs (2-6-

dichlorophénolindophénol...) ou par un procédé électrométrique, le potentiel d'oxydo-réduction.

Dans le deuxième cas, le potentiel est exprimé entre une électrode au calomel et une à H^2 . La variation de ce potentiel, traduite par une courbe, précise la nature du réducteur déjà caractérisé par la réaction violette.

Lorsque l'on opère dans un milieu biologique, l'acide ascorbique peut se trouver sous une forme combinée; il faut avoir soin, dans ce cas, de libérer par une hydrolyse prudente la fonction diénolique.

D'autre part, dans certains sucres de végétaux mis en conserve, on trouve la vitamine C en mélange avec son produit de dégradation, dénué de propriétés antiscorbutiques, mais conservant la fonction diénolique. La détermination de la teneur en diénol donnera donc un chiffre supérieur à celui qui correspond à la concentration réelle en vitamine active. La courbe obtenue sera déformée par rapport à celle de l'acide ascorbique. Il suffira de diminuer ce chiffre pour obtenir la coïncidence des deux courbes donnant la concentration réelle en vitamine C.

D'autres méthodes, plus fréquemment utilisées donnent, malgré la possibilité d'erreurs toujours difficiles à éviter, des précisions suffisantes. Leur contrôle par les procédés biologiques atteste, la plupart du temps, leur exactitude. Ces méthodes sont fondées sur l'utilisation des propriétés réductrices de l'acide ascorbique; les réactifs seront donc tous des oxydants. Avant d'en montrer les caractéristiques, il est nécessaire d'exposer les conditions dans lesquelles

ces dosages doivent être réalisés pour obtenir des résultats satisfaisants. La titration ne peut se faire sur le liquide ou le jus provenant, soit du broyage des organes d'animaux, soit de l'expression de tissus végétaux. Il est d'abord nécessaire de préparer des extraits. Pour cela, on traite les tissus avec des acides qui déchirent les cellules et entravent l'action des enzymes au moment de la libération du liquide cellulaire. L'acide trichloracétique sera employé pour les substances animales et l'acide acétique pour les végétaux. On pèse quelques grammes de tissu, que l'on triture dans un mortier avec du sable blanc lavé, et on ajoute une proportion déterminée d'acide trichloracétique ou acétique dilué, suivant les cas. On mélange. Le produit est centrifugé et l'extrait clair est décanté. On épuise le résidu du mortier à plusieurs reprises avec une petite quantité de cet extrait; on centrifuge séparément, puis les liquides décantés sont mélangés et l'extrait obtenu est complété au volume désiré. Une partie est utilisée pour le dosage; on la dilue avec de l'eau ou une solution d'acide acétique ou trichloracétique.

Substances gênant le titrage

L'action de plusieurs substances réductrices et l'oxydation provoquée par les diastases rendent quelquefois difficile l'évaluation de l'acide ascorbique recherché. Parmi les réducteurs, il faut citer le glutathion, la cystéine et des composés phénoliques: le pyrogallol, la pyrocatéchine, l'acide protocatéchique,

l'hydroquinol, de même que l'acide glucique, etc... Les solutions alcalines chauffées de glucose, de saccharose ont également les mêmes propriétés. Ces substances, contenues dans un liquide à titrer, fausseront donc les résultats. On trouvera une valeur d'acide ascorbique supérieure à la quantité réelle.

L'extrait des glandes surrénales et le jus d'oignon présenteront ces inconvénients. Les enzymes oxydantes déterminent, au contraire, une diminution de la capacité réductrice des milieux. L'acide ascorbique oxydé ne peut plus être titré. Aussi, la quantité évaluée sera inférieure à celle de l'acide actif. Il se produira une erreur par défaut. Le cas est fréquent chez les plantes peroxydasiques (chou, carotte); la phénoloxydase est rendue active par la trituration.

Les dosages sont tous réalisés en milieu plus ou moins acide. Les solutions alcalines ou neutres ne font pas éviter les erreurs dues au glutathion. La cystéine, au contraire, agit encore en milieu acide. EMMERIC a proposé une méthode d'élimination. On défèque l'extrait préparé avec de l'acétate mercurique et l'on régénère l'acide ascorbique oxydé en faisant agir H^2S . Cette opération est effectuée en milieu acide pour empêcher la formation de composés sulfurés. L'hydrogène sulfuré est ensuite chassé par de l'azote.

Méthodes de titrage

On titre le plus souvent la vitamine C par le 2-6-dichlorophénolindophénol et par l'iode.

Le premier réactif est contrôlé par une solution

étalon d'acide ascorbique, elle-même vérifiée par une liqueur titrée d'iode. Une molécule d'acide ascorbique réduit deux atomes d'iode.

*Contrôle de la solution d'acide ascorbique par l'iode
et de la solution du réactif phénolindophénol
par l'acide ascorbique*

Exemple donné par HARRIS et RAY :

On a titré 10 cm³ d'une solution d'acide ascorbique (contenant 1 mg. 72 d'un spécimen d'acide ascorbique) avec une solution 0.00677 N d'iode. La quantité d'iode était égale à 2 mg. 31. La quantité d'acide ascorbique présent est donc égale à 1mg. 60.

Vérification du réactif : le volume de réactif nécessaire pour oxyder les 10 cm³ d'acide ascorbique était égal à 2 cm³ 7.

2 cm³ 7 de réactif = 1 mg. d'acide ascorbique.

1 cm³ de réactif = 0 mg. 6 mg. d'acide ascorbique.

La solution d'acide ascorbique ne contient que 93 % de facteur réducteur (à pouvoir réducteur intégral).

ZILVA, en 1927, mesura le premier le pouvoir réducteur des liquides antiscorbutiques d'après leur capacité à décolorer un phénolindophénol. Il utilisa le para diméthylaminophénolindophénol.

SZENT GYÖRGYI, plus tard, proposa la méthode par l'iode; mais des expériences montrèrent que l'iode était sensible à de nombreux réducteurs autres que l'acide ascorbique. Il constata que du jus de citron chauffé et exposé à l'air pour détruire la vitamine C

le réduisait encore. SZENT GYÖRGYI expliqua cette action par la production de composés phénoliques qui se formaient pendant l'ébullition.

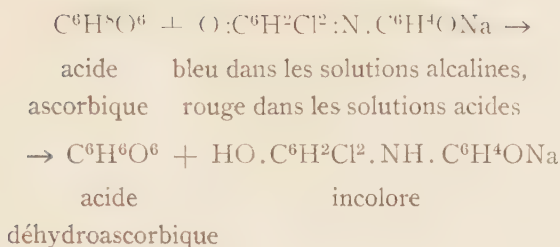
Le dosage par l'iode a donné de bons résultats dans le cas du jus de citron frais. Il est actuellement aussi fréquemment employé que le dosage par le 2-6-dichlorophénolindophénol et donne des résultats aussi satisfaisants.

SZENT GYÖRGYI, en 1928, employait le dibromophénolindophénol. En 1932, TILLMANS utilisait le dichlorophénolindophénol. Ce constituant est bleu dans les solutions neutres ou alcalines et rouge dans les solutions acides. Il se décolore en présence des réducteurs.

BIRCH, HARRIS et RAY emploient la méthode de Tillmans, qu'ils modifient. La solution à titrer est examinée à un PH amené à 2,5 par l'addition de quelques gouttes d'acide acétique. On verse le réactif sur 5 cm³ de jus d'orange, par exemple, jusqu'à ce qu'il ne soit plus réduit. Le terme de la réaction est indiqué par l'apparition d'une coloration rouge en milieu acide.

La plupart du temps, pour effectuer les dosages il faut avoir recours aux modes d'extraction courants et, parfois, procéder à une décoloration.

La manipulation doit être terminée au bout de deux à trois minutes. Le réactif et l'acide ascorbique réagissent molécule à molécule :



Taux de l'acide ascorbique du jus de citron

Selon HARRIS et RAY

1 cm³ de solution d'acide ascorbique (à environ 0,1 %),
réduit :

1,2 cc. de la solution du réactif (dichloro...).

2,57 cc. de solution 0,00453 N d'iode.

Donc, 1 cc. de réactif = 0,8 mg. d'acide ascorbique.

2 cc. de jus de citron à PH 2,5 réduisent 1,4 cc. de réactif.

2 cc. de jus de citron contiennent donc 1,1 mg. d'acide
ascorbique.

BESSEY et KING modifièrent également la méthode de Tillmans. Ils améliorèrent les qualités du réactif en ajoutant une petite quantité du phosphate jusqu'à l'obtention d'un PH égal à 6,8. Les mêmes auteurs estiment que l'erreur produite dans le dosage de l'acide ascorbique sur les extraits d'organes des animaux s'élève à 6 et 8 %, et serait causée par l'acide trichloracétique et les substances réductrices. Mais elle est plus faible dans l'évaluation de la vitamine C des tissus végétaux : elle n'atteindrait que la proportion de 2 à 3 %. Dans le cas des tissus d'animaux, la

présence du glutathion et de l'acide trichloracétique produit une lente décoloration de l'indicateur, qu'il ne faut pas confondre avec le titrage de la vitamine C.

BENNETT et TARBERT titrent le pouvoir réducteur du jus de citron en milieu légèrement acide, à un P_H égal à 6. A cette acidité, le terme de la réaction est plus visible. Le réactif peut être versé rapidement. La fin de la réaction est indiquée par une coloration bleu violacé persistant pendant une demi-minute. Le liquide titré, redevient bleu foncé par suite de l'oxydation de l'indicateur. Pour obtenir le P_H nécessaire, on ajoute de l'acétate de soude. Lorsqu'il s'agit de jus d'orange, on augmente l'acidité en laissant tomber quelques gouttes d'acide acétique.

Dans la méthode générale, le titrage est terminé en moins d'une minute. Quant à la coloration, elle disparaît après une demi-minute.

*Emploi d'une glucoréductone pour l'étalonnage
des solutions de dichlorophénolindophénol*

Les solutions de 2-6-dichlorophénolindophénol s'altèrent rapidement, et il devient quelquefois difficile de noter le terme de la réaction. Il est nécessaire de les contrôler avec une solution d'acide ascorbique; mais celle-ci n'est pas toujours utilisable.

KERTESZ recourut à une autre substance.

On avait observé que lorsqu'on chauffait des solutions alcalines de sucres, les produits de décompositions formés étaient capables de réduire le dichloro-

phénolindophénol. VON EULER et KLUSSMANN ont étudié le mode de production et les caractéristiques de ces corps très réducteurs, auxquels ils donnèrent le nom provisoire de réductones. VON EULER et MARTIUS ont isolé une glucoréductone dont le pouvoir réducteur développé vis-à-vis du dichlorophénolindophénol était environ une fois et demie supérieur à celui de l'acide ascorbique pur. Sa préparation, indiquée par KERTESZ, est la suivante : On chauffe 12 minutes à 80° . 5 cm^3 de solution à 0,5 % de glucose, additionnée de 0 cm^3 5 de NaOH 0,5 N et on y ajoute, après refroidissement, 1 cm^3 de ClH à 10 %. Un chauffage prolongé, dépassant une durée de 15 minutes, diminue son pouvoir réducteur, ce qui est probablement dû à la décomposition de la réductone par l'alcali.

On titre, en employant la méthode de Tillmans modifiée ou le microdosage de Birch, Harris et Ray. On opère avec une quantité de 0,10 à $0,50\text{ cm}^3$ de solution de dichlorophénolindophénol. Lorsque la coloration rose disparaît, on divise la solution en deux, et on ajoute à nouveau une goutte de glucoréductone. En effet, l'emploi d'une solution récente de réactif n'empêche pas la production d'une teinte brune ; mais un excès de solution étalon permet d'éviter cet inconvénient.

1 cc. de la solution de réductone correspond à 0 mg. 25 d'acide ascorbique.

Cette solution est utilisée lorsque le titre de la solution d'acide ascorbique devient douteux.

Recherche de la vitamine C
par la méthode au nitrate d'argent

De nombreuses recherches ont fait connaître la répartition de la vitamine C dans l'organisme. Cependant, il était possible de compléter les données que fournissaient les dosages biologiques et chimiques. En transportant dans le domaine histologique les propriétés de la vitamine C, on a pu préciser sa distribution dans l'intimité des tissus et même jusque dans la cellule. L'acide ascorbique présente une oxydabilité remarquable, mais d'après GREEN, c'est sous sa forme réduite qu'on le trouve dans les tissus. Seule une faible partie existe sous la forme oxydée. D'après BEZSSONOFF, il serait présent dans les tissus sous forme de dérivés.

Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique sur le nitrate d'argent a servi à le déceler macroscopiquement dans les organes. Les premières expériences ont été réalisées par QUICK, SIEHRS et MILLER, GOUGH et ZILVA après que SZENT GYÖRGYI eût montré le noircissement tout particulier de la cortico-surrénale.

L'organe, intégralement ou en partie, était mis en contact du nitrate d'argent, et l'on pouvait observer son noircissement plus ou moins intense.

Cette réaction permettait de classer les organes à peu près de la même manière que les dosages biologiques et chimiques, mais elle était toutefois insuffisante pour distinguer ce qui revenait dans un organe à tel tissu ou à tel élément tissulaire.

BOURNE eut l'idée de transposer cette caractérisation macroscopique dans le domaine histologique. Malheureusement, il employa une technique comprenant une fixation préalable aux vapeurs de formol, ce qui détruisait l'acide ascorbique et permettait une réduction indépendante du nitrate d'argent.

Technique microchimique

GIROUD et LEBLOND ont utilisé comme base de cette technique les propriétés qu'a l'acide ascorbique de réduire le nitrate d'argent, même acide.

Le nitrate d'argent est, en effet, réduit par les sucres, les polyphénols, etc..., alors que le nitrate d'argent acide l'était beaucoup plus difficilement. Les solutions étaient employées à des concentrations variant de 1 à 10 %, additionnées d'acide acétique, de façon à obtenir un PH voisin de 4. Le réactif ainsi préparé n'est pas réduit, *in vitro*, par les sucres (glucose et lévulose), ni pratiquement modifié par les phénols (adrénaline, tanin). De même, les composés sulfhydrylés tels que le chlorhydrate de cystéine et le glutathion sont sans action. La créatinine est également inactive.

GIROUD et LEBLOND utilisèrent une solution de nitrate d'argent à 10 %, additionnée de 1 % d'acide acétique. La réaction est positive, *in vitro*, avec une solution d'acide ascorbique au 1/50.000°. Ce réactif est introduit dans les cellules par une injection interstitielle ou par voie vasculaire. Dans ce cas, les vaisseaux sont préalablement lavés avec une solution neu-

tre. Le réactif est éliminé après un contact de cinq à dix minutes avec les tissus par lavage à l'eau distillée. Le nitrate d'argent, fixé mais non réduit en argent métallique, est dissous par l'hyposulfite. On procède à un dernier lavage, et les organes sont coupés après congélation, étudiés directement ou montés à la paraffine suivant la technique histologique classique (alcool, toluène, paraffine). Les divers tissus et cellules réduisent le nitrate d'argent à des intensités différentes et laissent apparaître des grains d'un noir plus ou moins intense d'argent métallique. Cette réaction est-elle spécifique? On aurait pu en douter, vu qu'il existe dans l'organisme des corps très réducteurs tels que l'acide glycuronique, l'acide hexose phosphorique. Mais de nombreux faits la confirment. Les résultats de la réaction sont comparables dans l'ensemble à ceux que donne l'analyse biologique et chimique. Ils sont semblables aussi bien pour les objets d'origine animale que végétale. Il y a également une concordance chronologique. La réduction du nitrate d'argent apparaît simultanément avec les propriétés antiscorbutiques, c'est-à-dire avec la production d'acide ascorbique pendant le développement des graines. Les oxydants font disparaître la réaction, de même qu'elle ne se produit plus dans les tissus après lavage par un solvant de l'acide ascorbique. Chez le cobaye soumis au régime scorbutigène, on voit la réaction diminuer; au bout de 5 jours elle est faible et, au bout de 10 jours, elle est à peine visible. Ces données correspondent à la disparition de l'acide ascorbique mesuré par la méthode biologique dans la

surrénale (HARRIS et RAY) et dans le foie (PARSONS et HUTTON). Par contre, si l'on donne à ces animaux de la vitamine C (sous forme de jus d'orange), la réduction du nitrate d'argent réapparaît en quelques heures. En leur donnant de très fortes doses, on peut même voir des réactions supérieures à la normale au niveau du foie.

Il y a donc des rapports très nets entre les réactions histochimiques et la vitamine C. Si la réaction est produite par d'autres substances, il faut admettre que celles-ci sont en liaison intime avec la vitamine C.

*Méthodes de colorations
utilisées par Gough et Silva*

La fixation se faisait au formol; on montait à la paraffine et colorait avec l'hémalum et l'éosine. Les tissus adipeux étaient examinés sur sections congelées et colorées au Sudan III et à l'hémalum. Dans les examens cytologiques, on employait la méthode mitochondriale de Gough et Fulton et la réaction au chrome suivant la méthode d'Ogata.

Dosage. — Miss HARDE a réussi récemment à doser la vitamine C par le nitrate d'argent en utilisant les propriétés dissolvantes de l'alcool méthylique.

CHAPITRE II

ÉTALONNAGE DE LA VITAMINE C

Avant la détermination des caractères de l'acide ascorbique, isolé en 1928 par SZENT GYÖRGYI, la Conférence Internationale de Londres, organisée en juin 1931, avait adopté provisoirement comme étalon le jus frais de citron (*citrus limonum*), simplement décitraté.

L'unité de vitamine antiscorbutique était représentée par la quantité de vitamine C contenue dans 0 cm³ 10 de jus frais de ce « Citrus limonum ». Elle était égale « au dixième de la dose quotidienne nécessaire pour éviter le développement des lésions scorbutiques macroscopiques chez un jeune cobaye soumis à un régime scorbutigène. »

Le jus pressé était préparé de la manière suivante :

On le passait à travers un tamis de mousseline et on ajoutait un excès de CO³Ca jusqu'à arrêt de l'effervescence. Après un repos d'une heure, on filtrait le mélange sur un filtre de Büchner. Le jus décitraté ainsi obtenu devait avoir une réaction d'environ P_H 6.

En 1932, SZENT GYÖRGYI démontre les propriétés antiscorbutiques de l'acide, qu'il appelait « hexuro-nique ». Une dose quotidienne de 1 mg. protégeait indéfiniment les cobayes recevant un régime carencé en facteur C. Les expériences entreprises par la suite montrèrent que 1 mg. d'acide ascorbique correspondait à 1 cm³ 5 de jus de citron, c'est-à-dire à 15 unités internationales.

Le jus de citron employé comme étalon présentait de graves inconvénients. Son pouvoir antiscorbutique était très variable. Différents spécimens possédaient des teneurs en acide ascorbique allant de 0,19 à 0,69 mg. par centimètre cube, soit une moyenne de 0,47 mg. L'activité du jus d'orange était plus constante. Aussi, HARRIS et RAY l'employèrent-ils de préférence au jus de citron. 1 cm³ de jus d'orange contenait une dose de 0,6 à 0,7 mg. d'acide ascorbique, quantité égale à celle d'un jus de citron riche en vitamine C. De plus, il pouvait être administré directement. Toutefois, l'acide ascorbique présentait de plus grands avantages, et l'on entrevoyait déjà la possibilité de le substituer aux deux substances précédentes. En effet, bien protégé, il pouvait être gardé intact. Conservé dans des tubes remplis d'azote, pendant trois mois, son pouvoir antiscorbutique ne diminuait pas. Il pouvait donc être utilisé sans contrôle pendant un temps assez long; en outre, son titrage était plus rigoureux. La 2^e Conférence Internationale de Londres, tenue en juin 1934, recommanda l'emploi de l'acide ascorbique lévogyre. Elle proposa comme unité internationale « une valeur correspon-

dant à l'activité en vitamine C de 0 mg. 05 d'acide lévogyre, c'est-à-dire environ le 1/10 de la dose journalière nécessaire pour empêcher la formation de sérieuses lésions scorbutiques macroscopiques chez un jeune cobaye soumis à un régime scorbutigène ».

L'Institut de Chimie Médicale de Szeged, par l'intermédiaire du Professeur SZENT GYÖRGYI, fut invité « à fournir 500 gr. de la préparation étalon et d'obtenir le concours du Professeur HAWORTH, de l'Université de Birmingham, pour le contrôle de la pureté de la substance étalon. Le « National Institute for Medical Research » de Londres fut invité à se charger de sa conservation et de la distribution de l'étalon de vitamine C.

Mode d'emploi. — « L'étalon peut être conservé à la température de la chambre dans un tube scellé ou un dessiccateur privé d'air ; immédiatement avant l'administration quotidienne à l'animal en expérience, la quantité nécessaire de substance doit être dissoute dans de l'eau qui a été distillée dans un appareil en verre et qui vient d'être bouillie et refroidie ».

L'acide ascorbique devra présenter les caractéristiques suivantes :

a) Point de fusion 192° .

b) Pouvoir rotatoire (α) $D/20^{\circ} = + 20^{\circ}0$ dans l'eau (Conc. 14 gr. % ; (α) $D/20^{\circ} = + 22^{\circ}4$ dans l'eau (Conc. 2 gr. 2 %).

c) Spectre d'absorption caractérisé par une bande unique intense avec un maximum à $\lambda = 245 \mu$. Coef-

ficient d'extinction moléculaire: 10.000 pour une solution contenant 20 mg. par litre.

d) 10 mg. exigent 11 cm³ 4 de solution aqueuse d'iode de centinormale.

e) La substance doit être exempte de cendres; son analyse élémentaire doit satisfaire à la formule C⁶H⁶O⁶; elle cristallise en plaques rectangulaires, avec biréfringence élevée:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Nb } 1,68 \pm 0,005 \\ \text{Na } 1,47 \pm 0,005 \end{array} \right\} \text{ pour la raie D du Sodium.}$$

CINQUIÈME PARTIE

LA VITAMINE C
CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPALES SOURCES DE VITAMINE C

On sait que la première source employée par SZENT GYÖRGYI pour l'extraction de la vitamine C était la corticosurrénale de bœuf. Sa teneur en acide ascorbique était très élevée. 1 gr. de corticosurrénale, d'après HARRIS et RAY, contient une quantité de vitamine C égale à celle que renferment 3 cm³ de jus d'orange, c'est-à-dire une dose variant de 1 mg. 8 à 2 mg.

Le paprika, ou « Capsicum Annuum », comme nous l'avons vu précédemment, possède un pouvoir antiscorbutique très élevé et, ajoutait SZENT GYÖRGYI, la vitamine C était localisée dans un milieu cellulaire qui rendait facile son isolement.

1 cm³ de jus de paprika titré avec une solution 0,01 N d'I donnait une valeur correspondant à 2 mg. d'acide ascorbique par gramme.

La mangue est également riche en vitamine C.

Certaines variétés, ALPHONSO (Surat) et ALPHONSO (Bombay) ont un pouvoir qui varie entre 20 et 30 unités internationales, c'est-à-dire correspondant au minimum à 2 cm³ de jus de citron et au

maximum à 3 cm³ (cette valeur est comprise entre 1 mg. 3 et 1 mg. 8 par gramme).

La feuille de l'Iris Germanica constitue aussi une des meilleures matières premières pour l'obtention de la vitamine C. BAUMANN et METZGER réussirent, par une méthode simplifiée, à en isoler une quantité égale à 600 mg. par 100 gr. de feuilles fraîches.

D'autres substances possèdent sans doute des teneurs aussi élevées. On a constaté, depuis quelque temps, que la cortico-surrénale n'était pas la seule à contenir une quantité exceptionnelle en vitamine C. Certains tissus en sont tout aussi riches. De même, beaucoup de végétaux ont une grande activité antiscorbutique.

L'énumération de ces quelques sources, dans le présent chapitre, n'a d'autre but que de préciser le taux que peut atteindre la vitamine C et attirer l'attention sur deux substances dont l'utilisation a beaucoup contribué à son étude.

CHAPITRE II

LA VITAMINE C CHEZ LES VÉGÉTAUX

ZILVA, BRACEWELL et d'autres auteurs étudièrent l'activité antiscorbutique de plusieurs fruits, en particulier celle de l'orange, de la pamplemousse et de la pomme. Ils ont constaté que la quantité de vitamine C dépendait, dans une certaine mesure, de la variété du fruit. La pamplemousse, variété Duncan était légèrement plus active que les variétés du Honduras et de l'Afrique du Sud. Les mêmes observations peuvent être faites pour les oranges. Parmi les pommes, la variété Branley's Seedling est la plus active; au second rang revient la variété Lanes's Prince, puis la Newton Wonder et la Cox's Orange Pippin.

Le pouvoir antiscorbutique des plantes et des fruits ne varie pas suivant les différents moments de la journée. La saison n'a de même aucune influence. La teneur des Bramley's Seedling cueillies à la fin de juin est semblable à celles des Bramley's Seedling cueillies en octobre. C'est uniquement vers la fin de la saison que la quantité du jus diminue; le taux en vitamine reste constant. Ceci se produit également lors-

qu'on laisse vieillir le fruit sur l'arbre ou lorsqu'il se dessèche pendant la conservation.

La conservation a un grand pouvoir de destruction de la vitamine C ; mais elle n'agit qu'à longue échéance, surtout pour les fruits. Les oranges achetées sur le marché gardent toutes leurs propriétés. Un fruit conservé, dans les conditions ordinaires, à environ 15° pendant deux mois, ne perd pas de vitamine. La pomme Bramley's Seedling, conservée à 3° en présence de l'air pendant cinq mois, ne perd rien de son activité antiscorbutique. Abandonnée pendant quatre mois à une température de — 20°, son taux en vitamine ne diminue pas d'une manière appréciable. Ces exemples ne s'appliquent qu'aux fruits. Il est probable que d'autres tissus moins bien protégés voient décroître plus rapidement leur quantité de vitamine.

La maturation n'apporte aucun changement dans la teneur en vitamine C ; elle ne détermine qu'un accroissement en sucre total (sucre réducteur, saccharose) et une diminution de l'acidité.

Ni le climat, ni le sol, ni l'origine ou l'âge de l'arbre n'exercent d'influence sur les variations du taux en vitamine C.

Répartition de la vitamine dans la pomme

On a étudié la teneur en vitamine de trois parties de la pomme. La pelure ; la partie externe et interne de la zone corticale.

La pelure contient trois à quatre fois plus de vitamine que la partie externe de la zone corticale et six

fois plus que la partie interne de cette même zone. La partie externe est un peu plus active que la totalité de la partie interne.

Le taux en vitamine augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche du cœur. Les pépins n'ont aucune activité.

Cette inégalité en vitamine C dans les différents tissus de la pomme a peut-être une signification physiologique; car elle concorde avec la répartition de certaines enzymes.

Voici, selon BESSEY et KING, les quantités de vitamine trouvées dans différentes feuilles:

	Mg. par g.
Erable	1,3
Lilas	0,22
Bouillon blanc	0,13
Herbe	0,73

BIRCH, HARRIS et RAY nous offrent les résultats suivants:

	Mg. par g.
Chou	1,0
Cresson	0,67
Jus de citron	0,62
	0,60
Jus d'orange	0,75
	0,59
	0,48

	Mg. par g.
Jus de mandarine	0,37
Jus de pamplemousse	0,65
	0,59
Jus d'ananas	0,30
Jus de tomate importée	0,21
Banane	0,15
Pomme de terre	0,15
Rhubarbe	0,059
Carotte	0,028
Raisin	≤ 0,030
Jus de pêche importée	0,015
Raifort	1,6

POMMES

Bramley's Seedling:

Zone corticale	0,16
Pelure	0,77

Newton Wonder:

Zone corticale	0,053
Pelure	0,24

Blenheim Orange:

Zone corticale	0,031
Pelure	0,33

Edward VII:

Zone corticale	0,017
Pelure	0,12

Cox's Orange Pippin:

Zone corticale	0,016
Pelure	0,09

CHAPITRE III

LA VITAMINE C CHEZ LES ANIMAUX

Caractérisation de la vitamine C dans les tissus de l'animal par la méthode au nitrate d'argent

En 1928, SZENT GYÖRGYI montrait que la cortico-surrénale réduisait le nitrate d'argent. Cette réaction était due à la présence d'un facteur réducteur qu'il isola plus tard : l'acide ascorbique. En 1933, GOUGH et ZILVA utilisèrent la méthode au nitrate d'argent pour caractériser la vitamine C dans plusieurs glandes (pituitaire, surrénale, et l'ovaire) d'espèces animales différentes. Ils prirent comme sujets d'étude, l'homme, le bœuf, le chien, le chat, le cobaye et le rat.

La corticosurrénale se colorait avec intensité, mais la réaction était encore plus nette sur le lobe antérieur et, à un moindre degré, sur le lobe intermédiaire de la glande pituitaire. Chez l'homme en particulier, la réaction était plus forte dans la glande pituitaire que dans la corticosurrénale. La réduction se produisait même dans la glande pituitaire d'un enfant mort-né et d'un enfant venu avant terme (à la 35^e semaine) et qui ne vécut que 6 heures, alors que la corticosurrénale ne se colorait pas.

Malgré ces résultats, GOUCH et ZILVA trouvaient la méthode au nitrate d'argent insuffisante; ils ne purent obtenir d'autres déterminations.

Au-dessous de certaines doses de vitamine C, la réaction devenait négative. C'est ainsi qu'après un traitement au nitrate d'argent, 42 glandes surrénales d'origine humaine ne présentaient, dans un grand nombre de cas, aucune coloration. Le foie lui-même, qui contient pourtant une quantité importante de vitamine, restait sans action.

GIROUD et LEBLOND réussirent à obtenir des précisions plus grandes, au point de pouvoir classer les tissus et les organes de l'animal suivant l'intensité des réactions correspondant à leur richesse en vitamine.

Tissus et organes ne présentant aucune réaction

Les glandes à sécrétion interne: thyroïde, parathyroïde, îlots de Langerhans du pancréas et le thymus. Dans le thymus, la réaction ne se produisait qu'au niveau des vaisseaux, mais non au niveau de ses éléments propres. Il faut citer encore les organes suivants: l'estomac, le pancréas exocrine et le poumon.

Pour ce qui est du tissu musculaire (muscle lisse, muscle squelettique, muscle cardiaque), les réactions ne se produisent qu'au niveau de la paroi des vaisseaux qui les irriguent.

Aucune réaction n'est constatée dans le tissu conjonctif proprement dit avec sa substance fondamen-

tale et ses édifications fibrillaires, ses équivalents (cartilage, os) et les différentes formes du tissu adipeux.

Tissus et organes agissant légèrement

La réduction est faible, mais précise, dans une partie de la glande surrénale: la médullosurrénale, de même que le tube séminifère avec ses divers éléments de la glande génitale mâle. Dans le foie, les quantités varient avec l'alimentation. Certains auteurs n'ont constaté aucune réaction (SZENT GYÖRGYI, HARRIS et RAY, etc...). Pourtant si l'on compare un foie normal avec celui d'un animal avitaminé, on observe une différence frappante. L'acide ascorbique ne se trouverait dans le foie qu'en faible partie, sous la forme réduite décelable par la méthode au nitrate d'argent. Par traitement préalable à l'alcool méthylique, Miss HARDE trouve une substance réduisant le nitrate d'argent. Le pouvoir réducteur direct du tissu hépatique est faible. Il est notable à l'état normal, disparaît pendant le scorbut et, d'autre part, s'accroît beaucoup pendant l'hypervitaminose.

Le foie serait un centre d'accumulation pour la vitamine C. La vitamine s'y trouverait sous une forme oxydée ou combinée.

Certaines espèces animales ne sont pas sensibles au scorbut et peuvent s'accommoder d'un régime carencé. La vitamine reste en permanence dans leurs organes. Chez d'autres, au contraire, en la décele à des niveaux différents. L'animal scorbutique, immédiatement après l'ingestion de jus d'orange, présente

une réaction sur la cellule principale de l'intestin, réaction qui apparaîtrait plus tard dans les organes et, en dernier lieu, au niveau des reins. Ces faits prouveraient sa circulation dans l'organisme, depuis le moment de son absorption jusqu'à son élimination. Chez l'animal hypervitaminé, la réaction, habituellement faible dans les tubes rénaux, y devient intense, ce qui correspond à une augmentation de la vitamine constatée dans l'urine par la méthode clinique. Dans certains cas, on observe dans le sang, une forte coloration des globules rouges. Les parois vasculaires réduisent aussi le nitrate d'argent, même jusqu'au point de permettre l'étude de leur distribution.

Des cellules également pauvres en vitamine C sont les cellules de l'épididyme et de diverses glandes à sécrétion externe (prostate). Le tissu nerveux donne aussi de faibles réactions.

Organes réduisant fortement le nitrate d'argent

Ces organes sont, par conséquent, riches en acide ascorbique. Parmi eux, on peut citer, quatre tissus : la corticosurrénale, le tissu interstitiel du testicule, le corps jaune de l'ovaire et la partie glandulaire de l'hypophyse (lobe antérieur).

La corticosurrénale présente une réaction intense ; la vitamine C s'y trouve abondante et régulièrement répartie. Ce sont les zones fasciculée et réticulée qui réagissent ; la zone glomérulée demeure à peu près incolore. La médullosurrénale ne réagit que faiblement.

Les glandes génitales réduisent fortement le nitrate d'argent. Dans les testicules, c'est le cas des cellules situées dans les espaces intertubulaires: cellules interstitielles, qui prennent une coloration noire. Les cellules des tubes séminifères ne sont que légèrement imprégnées. La réaction est forte dans les cellules du corps jaune, tandis qu'elle est faible dans le corps du tissu ovarien.

Les tissus cortico-surréaliens, luteïniques et interstitiels du testicule présentent de nombreuses similitudes du point de vue de l'origine, de la structure histologique, des enclaves lipidiques, des pigments, de diverses réactions histochimiques et de certains caractères physiologiques.

Parmi les organes riches en vitamine C, on peut encore citer le lobe glandulaire de l'hypophyse (lobe antérieur). On y distingue deux parties: La partie intermédiaire se colore d'une façon homogène, tandis que la partie antérieure se colore d'une façon hétérogène. La réaction est tout particulièrement notable au niveau des cellules chromophiles. Quant aux cellules chromophobes, elles se colorent avec une intensité plus réduite. Le lobe nerveux ne présente que les discrètes colorations du tissu nerveux.

Dans toutes les cellules, la réduction du nitrate d'argent se manifeste par l'apparition de grains d'argent métallique au niveau du cytoplasme. Le noyau reste toujours incolore. Au niveau du protoplasma, la réaction, chez l'animal normal, paraît le plus souvent localisée à des organites définis: Les mitochondries de Golgi. Dans les cellules riches en acide ascor-

bique, la réduction se fait au niveau du chondriome. Elle est particulièrement nette dans les cellules du corps jaune. Dans celles contenant moins d'acide ascorbique, la réduction, au contraire, se produit le plus souvent au niveau de l'appareil de Golgi.

L'acide ascorbique paraît exister dans le protoplasma et, en quantité moindre, dans les vacuoles. Le noyau n'en renfermerait pas.

Titrage par la méthode chimique

BIRCH, HARRIS et RAY ont estimé le taux de vitamine C de certains tissus et produits d'animaux. Leur titrage fut opéré par la méthode du microdosage au dichlorophénolindophénol.

Voici les quantités moyennes obtenues :

Capsule surrénale (partie corticale) ..	1,85 mg. par g.
Foie de bœuf	0,68
Lait de vache... (quantité variable)...	0,025-0,019
« Ostomalt »	0,27
Jaune d'œuf	0,00

La valeur antiscorbutique du lait est très faible et dépend de la saison où il a été recueilli. C'est ainsi qu'un lait obtenu aux époques de pâturages est toujours plus riche en vitamine C. BEZSSONOFF a évalué une teneur en acide ascorbique de 38 mg. par litre pour les laits d'été et de 28 mg. pour les laits d'automne. La perte due à l'ébullition serait inférieure à 33 %. Le lait soumis à la pasteurisation serait le plus carencé, pendant que le lait sec conserverait en partie son activité. Leur emploi en toutes saisons doit,

toutefois, être complété par une certaine dose de jus de citron ou d'orange.

SVIRBELY a donné également des indications sur la quantité de vitamine C contenue dans la glande surrénale et le foie de diverses espèces animales.

	ACIDE ASCORBIQUE	
	Mg. par g. (Moyenne)	
	Glande surrénale	Foie
Porc	1,15 (entière)	0,12
Bœuf	0,76 (cortico)	0,31
Veau	0,99 (entière)	0,33
Mouton	1,33 (entière)	0,46
Chien	1,46 (entière)	0,16
Soumis à un régime carné.		
Chat	1,22	0,18
Même régime.		
Lapin	2,16	0,11
Régime (avoine et trèfle sec) dépourvu de vitamine C.		
Lapin	1,83	0,08
Régime (avoine et trèfle sec) puis avoine seule pendant dix jours.		
Souris blanche	2,40	0,45
Régime (avoine, blé et pain humecté) dépourvu de vit. C.		
Rat	5,20	0,21
Même régime dépourvu de vit. C.		
Cobaye	1,24	0,23
Régime Sherman et haute dose d'épinard pendant 3 semaines.		
Cobaye	0,07	0,02
Régime Sherman, scorbut aigu.		

BESSEY et KING ont calculé la proportion d'acide ascorbique dans différents tissus du cobaye :

RÉGIME DE BASE SHERMAN plus haute dose d'épinard pendant 10 jours Mg. par g. (Moyenne)	
—	
Glande surrénale	0,75
Foie	0,10
Cervelle	0,14
Rein	0,087
Cœur	0,088
Muscle de la patte	0,032
Sang	< 0,02
Testicule	0,18

La méthode au nitrate d'argent permet d'évaluer une quantité plus grande dans le testicule. Les chiffres fournis par BESSEY et KING et compris entre 0,18 et 0,31 sont faibles ; le tissu interstitiel riche en vitamine C est dispersé entre les tubes séminifères et n'a pu être étudié par la méthode chimique. Dans le corps jaune de l'ovaire, HUSZAK trouve un chiffre élevé : environ 1 mg.

PHILLIPS et STARE ont dosé la vitamine C dans les tissus et les organes de la vache.

	Mg. par g. (Moyenne)
Muscle strié	0,018
Muscle du cœur	0,025
Muscle lisse du duodénum	0,043
Muscle de l'utérus	0,117
Glande mammaire	0,115
Pancréas	0,126
Partie corticale du rein	0,103
Thyroïde	0,190
Foie	0,250
Lobe post. de l'hypophyse	0,495
Glande surrénale	1,750
Cortico-surrénale	1,575
Lobe ant. de l'hypophyse	1,805

La quantité de vitamine C est faible dans les muscles striés et dans le cœur. La teneur des muscles lisses est variable; celle des muscles de l'utérus est quelquefois élevée et coïncide, dans ce cas, avec la présence dans l'ovaire d'un corps jaune très développé. La concentration est assez forte dans la thyroïde, le pancréas, la glande mammaire, le foie et le rein.

Comme nous l'avons vu plus haut, les quantités les plus considérables étaient celles de la corticosurrénale, du lobe antérieur de l'hypophyse et de la médullosurrénale qui, d'après HARRIS et RAY, peut contenir jusqu'à 20 unités internationales (1^{re} Convention),

c'est-à-dire 0,60 mg. $\times 2 = 1,20$ mg. d'acide ascorbique. La proportion la plus forte serait atteinte par la glande surrénale du rat, dont la quantité de vitamine serait égale à trois fois celle du bœuf et du cobaye et à dix fois celle du jus de citron, ce qui fait une dose de 6 mg. par gr.

Considérations physiologiques

La glande surrénale a une teneur élevée en vitamine C. On pourrait croire qu'elle constitue une réserve en acide ascorbique destinée à pourvoir au besoin de tout l'organisme. Son rôle a été comparé à celui du foie en ce qui concerne la vitamine A. Mais plusieurs raisons nous permettent de rejeter cette supposition.

La quantité d'acide ascorbique de la glande surrénale du cobaye ne dépasse pas 0 mg. 50. Elle est insuffisante pour assurer les dépenses de l'ensemble de l'organisme pendant plus de 24 heures. Au contraire, les réserves en vitamine A du foie peuvent être constituées pour toute la durée de la vie de l'animal. Les doses de vitamine C de la glande surrénale restent constantes, même lorsqu'on en incorpore une quantité importante au régime. L'hypervitaminose n'augmente pas sa proportion, tandis que dans le foie le taux en vitamine A dépend de la période pré-expérimentale. En outre, si la vitamine C s'accumulait dans la glande surrénale, on s'attendrait à la voir disparaître graduellement pendant l'épreuve du régime carencé et aucun symptôme scorbutique ne se révèle-

rait tant qu'il en resterait en réserve dans cette glande. C'est ce qui se produit pour la vitamine A dans le foie. Il en va tout autrement pour la vitamine C. Celle-ci persiste dans la glande surrénale pendant le scorbut; sa concentration diminue pendant l'évolution de la maladie. Au dixième et au douzième jour, alors que les modifications de la structure des dents sont nettement caractérisées, on peut encore en déceler une quantité appréciable dans la glande surrénale. Même après la mort de l'animal, elle n'a pas complètement disparu.

*Effets de la congélation et de la conservation
sur l'activité antiscorbutique du tissu hépatique*

MILLS, dans une expérience sur le foie de mouton, ajouta à un régime scorbutigène une quantité déterminée de chou, que l'on complète par des doses variables d'extrait de foie. L'extrait est administré au cobaye au moyen d'une pipette immédiatement après sa préparation. Une congélation de 6 jours, à la température de -19° , et suivie d'une décongélation, détermine une grande diminution de l'activité antiscorbutique du foie de mouton. 10 cm^3 de l'extrait sont insuffisants pour préserver le cobaye, tandis que la dose minimum d'extrait de foie frais est comprise entre 5 et 10 cm^3 . Le foie, conservé pendant six mois à la même température, perd la moitié de la valeur du foie conservé pendant six jours. 5 cm^3 de l'extrait du premier correspondent au pouvoir antiscorbutique de 10 cm^3 du second. La dose préventive du foie est

comprise entre 2,88 et 5,77 gr. Elle concorde avec celle du même organe d'autres animaux. Le froid doit retarder les transformations chimiques de la vitamine C et aider ainsi à sa préservation; mais au moment de la décongélation, les tissus déchirés libèrent des enzymes, qui la détruisent.

CHAPITRE IV

CARACTÈRES DIVERS

a) CARACTÈRES DE L'ÉLIMINATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR L'URINE

HARRIS, RAY et WARD ont dosé l'acide ascorbique dans l'urine, en utilisant le microdosage au dichlorophénolindophénol de Birch.

Ils ont constaté qu'après l'administration d'une forte dose de jus d'orange à des cobayes soumis à un régime scorbutigène, l'excrétion par les urines s'élevait rapidement au bout d'une heure. Elle atteignait son maximum à la troisième heure et revenait au niveau initial à la fin du troisième jour. Au sommet de la courbe, la concentration en vitamine C n'était pas inférieure à sept fois celle du chiffre normal.

Dans une expérience analogue, on continua pendant six jours et demi le régime scorbutigène, et la quantité de vitamine C excrétée restait toujours constante; elle était comprise entre 32,5 mg. et 35,3 mg. par jour, ce qui correspond à la dose normale d'élimination, soit environ 0,03 mg. par centimètre cube d'urine.

Chez l'homme, les constatations étaient identiques. HARRIS et RAY pensèrent que les 32 mg. d'acide ascorbique excrétés journellement étaient légèrement supérieurs à la quantité nécessaire pour éviter le scorbut.

D'après JOHSON et ZILVA, l'excrétion de l'acide ascorbique dépend de l'alimentation et des réserves de cet acide dans l'organisme. L'élimination de l'acide ascorbique diminuerait pendant la nuit et augmenterait dès le lever.

b) DIAGNOSTIC DU SCORBUT LATENT CHEZ LE NOURRISSON PAR L'EXAMEN DES URINES AU MOYEN DE L'ACIDE MONOMOLYBDOPHOSPHOTUNGSTIQUE.

HESS distingue trois formes principales de scorbut :

- 1° La forme aiguë ou classique.
- 2° La forme subaiguë, forme fruste, ou encore monosymptomatique.
- 3° La forme latente.

Nous n'insisterons ici que sur la forme latente, les deux premières se trouvant suffisamment caractérisées.

La forme latente ne se révèle par aucun signe clinique particulier. Sa recherche présente de grandes difficultés. KATZ en fait le diagnostic chez les nourrissons en interprétant les différentes colorations obtenues dans l'urine avec l'acide monomolybdophosphotungstique.

Le réactif de Bezssonoff donne trois réactions différentes :

1° Une réaction trouble qui n'apporte rien de spécifique.

2° Une réaction brune, produite chez les enfants qui ont passé par diverses sortes d'infection; les uns en voie de guérison, les autres demeurant dans un état de maladie stationnaire et présentant ou non des troubles digestifs. Cette réaction permet de distinguer deux cas :

a) L'enfant reçoit une dose insuffisante de vitamine C.

b) L'enfant en reçoit une dose suffisante, mais il se produit une destruction exagérée du facteur antiscorbutique par suite de la persistance d'une infection.

3° La réaction violette, normale chez les enfants en bon état de santé, et permettant d'exclure toute idée d'une carence en vitamine C.

CHAPITRE V

SYNTHÈSE DE LA VITAMINE C CHEZ LES VÉGÉTAUX

Les graines ne possèdent pas de propriétés antiscorbutiques; elles ne les acquièrent que par la germination. CHICK et DELF (1919) ont montré qu'on préservait du scorbut de jeunes cobayes dont le régime était additionné de 10 gr. ou 5 gr. de pois (*Pisum sativum*) germés depuis deux jours. En 1927, ZILVA emploie l'indophénol pour titrer l'acide ascorbique des graines germées. HARRIS et RAY (1933) opèrent avec l'indophénol sur des extraits à l'acide trichloracétique et trouvent les valeurs suivantes:

	Mg. par g.	Mg. dans une seule semence ou plantule
Graines de pois, avant germination...	0,00	0,00
Humectées pendant 24 h. (non germées).	0,08	0,02
Humectées pendant 48 h. (germées)...	0,69	0,21
Humectées pendant 72 h. (germées)...	0,82	0,26
Humectées pendant 96 h. (germées)...	0,86	0,27
Farine d'avoine	0,00	
Avoine graine entière	0,11	
Avoine après 96 h. de germination...	0,20	
Avoine après 120 h. de germination...	0,42	

Il est difficile, d'ailleurs, d'évaluer par la méthode chimique l'activité antiscorbutique des extraits de plantes ou de graines germées. L'acide ascorbique peut se présenter en partie sous sa forme oxydée, n'agissant pas sur le réactif et, en outre, plusieurs substances accompagnant cet acide peuvent réduire l'indophénol sans posséder de pouvoir antiscorbutique.

Les pois non germés ne possèdent aucune activité, mais réduisent pourtant l'indophénol.

Parmi les éléments de la plantule, la radicule a une très grande capacité réductrice, qui semble être due uniquement à la présence de l'acide ascorbique. Les cotylédons possèdent $\frac{5}{6}$ de la totalité des substances réductrices. Les travaux récents de RAY ont montré que c'est le deuxième jour de sa formation que la plantule atteint une teneur constante en acide ascorbique, qui serait égale à environ 0 mg. 5 par gramme de tissu sec. Certaines substances favorisent la synthèse de la vitamine C. En premier lieu vient le mannose. Le glucose, le fructose, le galactose, le saccharose, le maltose et le lactose permettent également d'en former, mais en quantité moindre. Enfin le xylose, l'amidon, la dextrine, le mannitol, etc..., n'exerceraient qu'une action faible ou nulle.

Il semblerait, d'après les observations de WALDMANN que, dans les graines, la vitamine C existât sous la forme de provitamine C. En effet, l'urine des oiseaux et des rats, nourris avec des graines entières, donne la réaction violette de Bezssonoff caractéri-

sant la vitamine C. Cette réaction cesse d'apparaître après quelques jours de régime au riz glacé. L'enveloppe des graines étant privée de vitamine C et ne donnant pas la réaction violette est supposée contenir la provitamine C encore inconnue.

CHAPITRE VI

SYNTHÈSE DE LA VITAMINE C

CHEZ LES ANIMAUX

Les animaux, contrairement à ce qui se passe chez les végétaux, ne réalisent pas tous la synthèse de la vitamine C. Le cobaye ne peut vivre soumis à un régime scorbutigène. Ses réserves en vitamine C préalablement constituées s'épuisent, et il meurt après un délai déterminé.

HARRIS et RAY ont montré la diminution de la vitamine C dans le foie et la glande surrénale du cobaye au fur et à mesure que l'on prolongeait la durée d'un régime carencé.

Ce sont d'abord les réserves du foie qui diminuent, puis celles de la glande surrénale :

TABLEAU.

	Mg. par g. Glande surrénale	Foie
Cobaye	1,70	0,20
Régime Sherman plus haute dose d'épinard pendant 4 jours.		
Cobaye	1,46	0,09
Epinard pendant 4 jours et régime scorbutigène (Sherman) pendant 24 heures.		
Cobaye	1,24	0,06
Epinard pendant 4 jours et régime scorbutigène (Sherman) pendant 72 heures.		

Si le singe est moins sensible que le cobaye à la carence de la vitamine C, il l'est cependant davantage que l'homme. ROHMER, BEZSSONOFF, SACREZ et STOERR pensent que le nourrisson humain synthétise la vitamine C durant les douze premiers mois. Un grand nombre d'animaux réalisent également cette synthèse et, eux, pendant toute leur vie. Parmi ces animaux, on peut citer tous les oiseaux et la plupart des mammifères (le chien, le chat, le bœuf, le mouton, le rat, la souris, le lapin, etc...).

HARRIS et RAY, en considérant la forte teneur en vitamine C de la glande surrénale du rat, ont pensé que la synthèse de cette vitamine se produisait dans cette glande. Des rats surrénalectomisés reçurent un régime scorbutigène, mais aucun symptôme de scorbut ne se manifesta après plusieurs jours d'expé-rien-

ce; les rats restaient en bon état de santé. L'épreuve ne pouvait cependant être considérée comme concluante. Une petite partie de la glande surrénale avait échappé à l'ablation et, en outre, il s'était reformé du tissu après l'opération. Il semble, néanmoins, que la synthèse n'ait pas lieu dans la glande surrénale.

La vitamine est indispensable à la vie; elle apparaît dès la formation d'un organisme. Les embryons d'oiseaux font la synthèse de la vitamine C pendant leur développement. CARRICK et HAUGE (1926) ont montré que les foies de poulets de cinq semaines nourris avec un régime scorbutigène, présentent déjà une réserve de vitamine C, et ceci bien que les œufs d'origine soient dénués de facteur antiscorbutique. Durant l'incubation, la vitamine C est produite par l'embryon qui se développe. RAY le démontre par l'expérience suivante: Il fait couvrir des œufs de Brown Leghorn et les ouvre après un moment déterminé d'incubation. Les embryons sont extraits et séchés; on les pèse rapidement et on les triture avec un peu de sable. On ajoute au mélange une solution d'acide trichloracétique jusqu'à l'obtention d'une certaine concentration. L'extrait obtenu est dilué et filtré. On titre avec le 2-6-dichlorophénolindophénol.

Les résultats peuvent être considérés comme exacts, car l'extrait contient peu de substances réductrices autres que l'acide ascorbique.

Jours d'incubation	Poids de la substance prise (g.)	Quantité d'ac. ascorbique (mg.)	Par g. de tissu frais	Par g. de tissu desséché
0	(a) blanc d'œuf : 27	0	0	0
	jaune d'œuf : 20	0	0	0
4	5 embryons entiers : 0,6	0,0745	0,124	2,98
	blanc d'œuf : 11,6	0	0	0
	jaune d'œuf : 20	0	0	0
6	2 embryons entiers : 0,89	0,143	0,160	3,04
8	1 embryon entier : 1,17	0,213	0,182	2,91
10	1 embryon entier : 2,68	0,630	0,235	3,38
12	1 embryon entier : 5,05	1,260	0,249	2,81
15	foie d'embryon : 0,50	0,132	0,764	—
17	foie d'embryon : 0,37	0,105	0,283	—
19	foie d'embryon : 0,65	0,178	0,274	—
21	foie d'embryon : 0,82	0,226	0,275	—
	foie de poulet			
	de 24 heures : 1,05	0,273	0,260	—

L'acide ascorbique apparaît dans l'embryon le quatrième jour de l'incubation.

HART et ses collaborateurs ont montré qu'il fallait trois grammes de foie de poulet pour constituer une dose curative chez le cobaye. Or, nous savons que 0 mg. 9 d'acide ascorbique est la dose curative minimum (HARRIS et RAY, 1933). Un gramme de foie de poulet contenant environ 0 mg. 26 d'acide ascorbique,

il faut donc 3, 4 gr. de ce foie pour constituer la dose curative.

Récemment, GUHA et GHOSH ont démontré que certaines substances participaient à la formation de l'acide ascorbique dans les tissus de l'animal.

Chez le rat, le mannose est transformé en acide ascorbique par les tissus du rein, du foie et de la rate.

Le glucose, le fructose, le galactose, l'arabinose et le xylose ne sont transformés que peu ou pas du tout

SIXIÈME PARTIE

ACTION BIOLOGIQUE
DE L'ACIDE ASCORBIQUE

CHAPITRE PREMIER

ROLE DE LA VITAMINE C CHEZ LES VÉGÉTAUX

BESSEY et KING ont trouvé une grande quantité de vitamine C dans les feuilles vertes. La vitamine C est aussi souvent associée aux pigments caroténoïdes, et il est certain qu'elle joue un grand rôle dans la photosynthèse.

Sa relation avec la chlorophylle paraît évidente. Ce sont les tissus verts qui contiennent le plus de vitamine C. MOLISH constata le premier que les plastes chlorophylliens étaient colorés par l'argent réduit. GUILLERMOND montra ensuite que ce fait se produisait dès l'apparition de la chlorophylle.

GIROUD, RATSIMANANGA et LEBLOND, de leur côté, étudièrent la teneur en vitamine C des tissus de plantes autotrophes (à chlorophylle) et hétérotrophes (sans chlorophylle). Le dosage fut effectué en employant, avec certaines modifications, la méthode de Tillmans.

Toutes les plantes à chlorophylle contiennent des quantités notables d'acide ascorbique.

GIROUD et LEBLOND fournissent les résultats suivants :

	Mg. par g.
<i>Viola tricolor</i>	1,36
<i>Capsella bursa pastoris</i>	0,50
<i>Zyguema</i> (algue)	0,40

On a comparé sur une même plante la teneur en vitamine d'organes riches en chlorophylle et d'organes sans chlorophylle. Les feuilles ont une concentration plus grande en vitamine que les racines normales ou les racines chargées de matières nutritives :

	Feuilles (mg.)	Racines
<i>Zea</i> (maïs)	0,96	0,05
<i>Lactuca sativa</i> (laitue)	0,31	0,08
<i>Cichorium endiva</i> (chicorée)	0,49	0,04
<i>Dahlia variabilis</i>	0,43	0,06
<i>Allium cepa</i> (oignon)	0,22	0,02

	Feuilles (mg.)	Racines à réserve
<i>Beta vulgaris</i> (betterave)	0,47	0,06
<i>Solanum tuberosum</i> (pomme de terre).	0,65	0,02 (tuberc.)

La différence est moins accentuée entre les feuilles normales et les pétales floraux :

	Feuilles	Fleurs blanches
<i>Rosa</i> sp.	1,88	0,52
<i>Dahlia variabilis</i>	0,25	0,12
<i>Lilium album</i>	0,03	0,01
<i>Syringa</i> sp.	0,99	0,19

Certaines parties ayant la même structure anatomique, mais ne différant que par la présence ou l'absence de chlorophylle, ont des teneurs différentes :

	Mg. par g.
<i>Allium porrum</i> (feuille) :	
Partie supérieure verte	0,40
Partie inférieure blanche	0,10
<i>Avena sativa</i> (en voie de développement) :	
Feuille, partie supérieure verte.....	0,52
Feuille, partie inférieure blanche...	0,35
<i>Beta vulgaris</i> (bette carde) :	
Feuille, partie verte (limbe).....	0,90
Feuille, partie blanche (pétiole et nervure médiane)	0,06

Les parties vertes sont toujours plus riches en acide ascorbique que les parties blanches. On a également comparé des parties chlorophylliennes et non chlorophylliennes de feuilles chez des plantes panachées de valeurs diverses (panachage banal, chimères). Les différences ne sont pas toujours très sensibles :

	Mg. par g.
<i>Aspidistra</i> (feuilles) :	
Partie verte	0,63
Partie jaunâtre	0,41
Feuilles d' <i>Aucuba japonica</i> :	
Partie verte	1,18
Partie jaune	1,16

On a observé la variation concomitante de la chlorophylle et de l'acide ascorbique dans un organe sui-

vant son stade de développement. L'acide ascorbique apparaît au moment de la germination, mais ne se manifeste en quantité importante qu'au moment de l'apparition de la chlorophylle. Les plants de blé développés dans l'obscurité restent pauvres en vitamine C, alors que ceux qui s'épanouissent à la lumière forment de la chlorophylle et sont riches en vitamine:

	Mg. par g.
Feuilles et tiges de blé étiolées (14 jours de développement)	0,15
Feuilles et tiges de blé verdies (14 jours de développement)	0,74

Des feuilles placées à l'abri de la lumière restent jaunâtres et, bien entendu, contiennent moins de vitamine C.

Au cours de l'involution automnale des feuilles, on constate la diminution de l'acide ascorbique, diminution succédant à la disparition de la chlorophylle:

	Mg. par g.
<i>Quercus robur:</i>	
Feuilles vertes	1,62
Feuilles jaunes	0,95
<i>Prunus cerasus:</i>	
Feuilles vertes	2,20
Feuilles jaunes	1,58

Il se présente cependant des exceptions. Chez la tanaïsie on a trouvé les mêmes proportions dans les feuilles, la tige et le rhizome. Dans l'œillet et le cycla-

men on a obtenu le même taux dans les feuilles et dans la fleur. Pour ce qui est de la tulipe et du muguet, on a constaté que les pétales floraux avaient une teneur supérieure aux feuilles. Dans une plante panachée, on a observé une quantité plus forte dans la partie argentée. Néanmoins, si l'on considère l'ensemble des résultats, on peut affirmer qu'il existe une liaison entre la chlorophylle ou, si l'on préfère, la fonction chlorophyllienne et l'acide ascorbique.

La teneur en vitamine C des plantes autotrophes est en général élevée. On a constaté des quantités supérieures à celles du pigment doux. La feuille de capucine contient 3,5 mg. de vitamine C et celle de la tubéreuse en contiendrait jusqu'à 6,3 mg. En outre, on peut ajouter qu'il y a un parallélisme entre les valeurs relatives de l'acide ascorbique des parties vertes et des parties blanches des plantes. Quand les tissus verts sont riches en acide ascorbique, on en recueille des quantités notables dans les tissus incolores. De même, quand il y a peu d'acide ascorbique dans les tissus chlorophylliens, on n'en trouve que de très petites quantités dans les tissus incolores. Les plantes hétérotrophes, c'est-à-dire celles qui ne synthétisent pas les glucides (plantes sans chlorophylle) ne renferment que des quantités insignifiantes d'acide ascorbique :

	Mg. par g.
Phanérogames hétérotrophes :	
<i>Neottia nidus avis</i> , hampe florale et	
racines	0,11
<i>Orobanche amethystea</i> :	
Tige, écailles foliaires	0,02
Fleurs	0,02

Ce titre est plus élevé chez une plante parasite contenant de la chlorophylle :

	Mg. par g.
<i>Viscum album</i> (gui), feuilles	0,60

Les champignons n'en contiennent que de très faibles doses, 0,04 mg. en moyenne. Les valeurs sont minimales, quelquefois même négatives ; mais il est à supposer que ceci est dû à une erreur de dosage, car il est difficile de concevoir désormais un organisme sans vitamine C. Les champignons en contiendraient donc, tout comme les animaux carencés, qui sont également des hétérotrophes.

CHAPITRE II

ROLE DE LA VITAMINE C CHEZ LES ANIMAUX

L'acide ascorbique joue un rôle important dans la respiration intracellulaire. Ce fait a été démontré en 1928 par SZENT GYÖRGYI.

L'acide ascorbique fonctionne comme porteur d'oxygène dans certains mécanismes d'oxydation; il accroît ou maintient l'intensité respiratoire; il s'oppose à l'action annihilante de certaines substances, qui viennent gêner ou entraver la respiration cellulaire.

Action de l'acide ascorbique dans les tissus des animaux

HARRISON a montré l'action de l'acide ascorbique sur l'oxydation des tissus *in vitro*. L'addition de cet acide à des tissus de cobayes scorbutiques augmente la respiration *in vitro*.

Les expériences ont été faites avec des fragments de foie et de muscle de la patte du cobaye. L'opération fut conduite de la façon suivante: Un échan-

tillon d'organe ou de muscle est plongé dans une solution de phosphate de Na au PH 7,4. On mesure la consommation d' O^2 de ces substances préalablement pesées dans l'appareil manométrique de Barcroft. La consommation d' O^2 d'un tissu d'animal scorbutique est augmentée lorsqu'on ajoute de l'acide ascorbique, alors que dans le cas d'un tissu normal elle s'accroît très peu. L'épreuve est faite en atmosphère d'oxygène et non d'air. L'addition de 0,25 mg. d'acide ascorbique à un fragment de foie scorbutique détermine une augmentation de l'intensité respiratoire de 5 à 57 %, en moyenne 25 %. Avec un fragment de foie normal, le résultat est invariable ou même légèrement décroissant. En opérant avec une portion de muscle, la quantité d' O^2 absorbée est légèrement croissante lorsqu'on ajoute 0,25 mg. d'acide ascorbique, tandis que l'accroissement devient notable avec le muscle du cobaye scorbutique. Les expériences ont prouvé que cette consommation d'oxygène est proportionnelle au poids du tissu employé.

PHILLIPS et STARE, reprenant des travaux semblables à ceux de SZENT GYÖRGYI en 1928, ont montré le rôle respiratoire de l'acide ascorbique. Ils ont choisi la vache comme sujet d'expérience. Un lot était soumis à un régime composé de produits de laiterie, auxquels on ajoutait du phosphate de chaux, de manière à former une ration bien équilibrée et tout à fait complète en substances nutritives. D'autres lots recevaient un régime semblable, complété pour le deuxième lot de 0,022 % de fluorure, de 0,044 % de fluorure pour le troisième et 0,088 % pour le

quatrième. Seul le premier recevait une ration normale. On tuait les animaux au bout de trois ans et on dosait la quantité de vitamine C des principaux tissus. Un tableau comparatif permet de constater que la teneur en vitamine C s'élève dans certains organes et tissus d'animaux soumis au régime fluoré et permet également de trouver une augmentation de vitamine proportionnelle au taux de fluorure introduit dans la ration. La thyroïde présente dans tous les cas une valeur constante. Il en est de même pour le pancréas. Le taux en vitamine C des glandes mammaires a une tendance à diminuer dans l'intoxication fluorée. Mais, par contre, la teneur du foie et du rein augmente quand on fait ingérer 0,088 % de fluorure. La même constatation peut être faite pour la corticosurrénale et le lobe antérieur de l'hypophyse.

	RÉGIME NORMAL Moyenne	RÉGIME NORMAL + 0,088 % de F Moyenne
Muscle lisse du duodénum..	0,043	0,085
Muscle strié	0,018	0,015
Muscle du cœur	0,025	0,025
Muscle de l'utérus	0,177	0,255
Glande mammaire	0,115	0,085
Pancréas	0,126	0,085
Partie corticale du rein	0,103	0,155
Thyroïde	0,190	0,215
Foie	0,250	0,370
Lobe post. de l'hypophyse..	0,495	0,550
Glande surrénale	1,750	1,790
Corticosurrénale	1,575	1,835
Lobe ant. de l'hypophyse...	1,805	2,215

Observons maintenant ce qui se produit lorsqu'on examine l'effet d'un cyanure sur l'intensité respiratoire de certains tissus prélevés sur les mêmes animaux. Plongeons les tissus ou organes dans la solution tampon au PH 7,3 de glucose et phosphate de Ringer et mesurons le pouvoir annihilant d'une solution N/300 de cyanure de sodium sur ces tissus. On constate que l'intensité respiratoire est diminuée par l'addition d'un cyanure. Le tissu du foie consomme entre 200 et 300 mm³ d'oxygène par gramme et par heure; cette quantité s'abaisse dans une proportion de 57 % avec le cyanure. Le rein consomme 450 mm³ par gramme et par heure, alors que l'on observe une diminution de 60 à 70 % lorsque la mesure est faite en présence de la même solution annihilante. Il ne se produit aucune différence avec les divers régimes. Pour la glande surrénale, la diminution est de 34 % chez les animaux soumis à un régime normal et 61 % chez les animaux recevant une ration comprenant 0,044 % de fluorure. La consommation en oxygène de la médullosurrénale varie de 209 à 244 mm³ par gramme et par heure, et diminue sous l'action du cyanure de 41 à 53 %. La consommation de la corticosurrénale est moins élevée; elle varie de 142 à 192 mm³. Par contre, les différences observées dans la diminution par le cyanure sont très marquées. Avec le régime normal elle atteint 16 %; avec le régime augmenté de 0,022 % de fluorure, elle est égale à 23 %, et pour le régime en comprenant 0,088 %, elle s'élève à 75 %.

Pour se résumer, on peut dire qu'il est frappant de voir la quantité de vitamine C s'élever dans les tissus d'un animal subissant une intoxication fluorée. Cette augmentation, observée dans le rein, le foie, la corticosurrénale et le lobe antérieur de l'hypophyse est indiscutable. L'exemple de la corticosurrénale nous montre une diminution de la consommation d'oxygène proportionnelle au taux de fluorure. Le volume d'oxygène absorbé décroît de 192 mm^3 à 147 mm^3 , et lorsque l'on emploie du cyanure, il se produit également un décroissement. L'action de la solution de cyanure est beaucoup plus grande sur les tissus fluorés que sur les tissus des animaux recevant une ration normale. L'intensité de la respiration diminue de 16 à 75 % suivant les taux de fluor ingérés par les animaux. Ceci semble prouver que la teneur de l'acide ascorbique, facteur important dans les phénomènes d'oxydation et de respiration, s'accroît pour venir compenser une diminution du taux respiratoire, diminution causée par l'intoxication fluorée et détruire ou résister à l'effet déterminé par les substances (ici représentées par un cyanure) qui gênent ou entravent la respiration. Car lorsque la respiration est diminuée, comme le montre la mesure de l'oxygène, l'effet du cyanure est accru très nettement :

	RÉGIME DE BASE		RÉGIME DE BASE					
	OU NORMAL		+ 0,022 F %		+ 0,044 F %		+ 0,088 F %	
	Consom- mation en O ²	Dimi- nution par CN	Consom- mation en O ²	Dimi- nution par CN	Consom- mation en O ²	Dimi- nution par CN	Consom- mation en O ²	Dimi- nution par CN
Foie	212	58	—	—	281	55	—	—
Cœur	334	61	—	—	—	—	—	—
Rein	449	69	465	68	405	60	440	70
Gl. surrénale	216	34	—	—	194	61	—	—
Gl. surrénale p. médullaire	209	48	244	41	—	—	226	53
Gl. surrénale p. corticale	192	16	154	23	—	—	145	75

Il existe donc une relation entre l'activité de la respiration et la concentration de la vitamine C. La diminution du taux d'acide ascorbique dans les tissus varie avec le régime, mais elle est d'autant plus grande que la concentration normale est plus forte.

La vitamine C dans les tissus du cobaye

	RÉGIME DE BASE SHERMAN + haute dose d'épinard pendant 10 jours Moyenne (mg. par g.)	RÉGIME DE BASE (sans vitamine C) pendant 15 jours Moyenne (mg. par g.)
	—	—
Glande surrénale ..	0,75	0,10
Foie	0,10	0,043
Cervelle	0,14	0,06
Rein	0,087	0,043
Cœur	0,088	0,029
Muscle de la patte	0,032	0,014
Sang	< 0,02	< 0,02
Testicule	0,18	0,088

Dans le sang, la vitamine C se présente sous sa forme d'oxydation réversible, car la tension d'oxygène est très élevée dans ce milieu par rapport à celle des autres tissus. La teneur en vitamine C des tissus d'animaux jeunes est plus forte que celle d'animaux plus développés, les régimes étant semblables pour les uns et pour les autres.

*Mesure de la vitamine C
dans les différents organes de l'homme
à des âges différents*

	20 mois	35 ans	60 ans	10 ans
	—	—	—	—
Glande surrénale ..	1,19	0,20	0,40	0,93
Foie	0,37	0,12	0,11	0,25
Rein	0,18			
Ovaire		0,15		
Cœur	0,09	0,08		
Rate	0,34			
Pancréas	0,30			
Cerveau		0,18		

La quantité élevée dans le corps jeune de l'ovaire et la corticosurrénale est en relation avec l'activité de ces tissus. Il est probable que la fonction de la vitamine C dans les différents tissus de l'organisme est identique; elle semble plus liée à la respiration et au métabolisme qu'à leurs fonctions spéciales. L'acide ascorbique est nécessaire au maintien de l'activité fonctionnelle de certaines cellules (ostéoblastes, odontoblastes, cémentoblastes, améloblastes) et les prévient d'un dépérissement prématuré.

CHAPITRE III

L'INFLUENCE DE LA VITAMINE C SUR LES ENZYMES INTRACELLULAIRES

HOPKINS qui, en 1921, découvre le glutathion, observe qu'il active certaines enzymes entracellulaires.

L'acide ascorbique présente des propriétés identiques.

En plus de son rôle antiscorbutique et de son action indirecte sur les phénomènes de la respiration, il possède le pouvoir d'un catalyseur. Il règle, tout comme le glutathion, l'équilibre des composés sulfhydrylés dont dépend l'activité de certaines enzymes protéolytiques. C'est ainsi que le pouvoir de l'arginase, ferment protéolytique, dépend de l'équilibre entre les groupements SH et SS des composés sulfhydrylés. Et cet équilibre étant déterminé par le maintien de potentiels définis d'oxydo-réduction, l'activité de l'arginase sera subordonnée au rôle de l'acide ascorbique. Le glutathion a une action semblable. Comme l'acide ascorbique, il permet la synthèse et l'hydrolyse des matières protéiques. L'arginase serait activée par le système : acide ascorbique + fer.

Par un mécanisme semblable, l'acide ascorbique, grâce à son pouvoir oxydo-réducteur, contribue également à la destruction des hydrates de carbone. C'est un activateur spécifique de la β amylase des animaux; il inhibe la β amylase des végétaux, mais n'a aucune action sur les α amylases. La forme oxydée de cet acide est sans effet sur la β amylase, mais inhibe l' α .

L'acide ascorbique a un pouvoir sur l'oxydation des acides gras, ainsi que le démontra récemment PURR.

Le rôle de la vitamine C est donc de première importance. Elle règle non seulement la respiration tissulaire et préside au métabolisme de nombreuses substances, mais est à la source même de toutes les manifestations de la vie.

CONCLUSION

Les données que l'étude de la vitamine C a révélées permettront d'orienter le problème de l'hygiène alimentaire dans des voies nouvelles. Pendant longtemps, la question des maladies par carence fut considérée sous un aspect bien différent de l'angle sous lequel nous l'étudions aujourd'hui. On ne se souciait des avitaminoses qu'au moment où elles se caractérisaient par des troubles assez graves. N'en connaissant pas l'origine, on se bornait à leur accorder les soins qu'inspirent en pareil cas la pitié humaine envers une maladie quelle qu'elle soit.

Et, bien entendu, les conditions de traitement ne se rapportaient que trop à l'ignorance des caractères de ces états d'avitaminose.

Les progrès réalisés au XIX^e siècle, grâce aux recherches chimiques, ont donné un véritable sens à la question. Le scorbut aigu est désormais effacé du tableau des calamités humaines, et on n'y retrouvera plus de ces cas terrifiants si fréquemment décrits par les praticiens d'autrefois. Aux essais de guérison inspirés par l'instinct et la routine a succédé l'application d'une véritable Science de l'Hygiène Alimentaire, rendue possible par la connaissance à peu près

complète du rôle capital joué par les vitamines. Il ne s'agit donc plus actuellement d'éviter des cas sérieux de carence ou, en ce qui concerne la question qui nous occupe, de scorbut, mais de réaliser une sorte de politique de l'alimentation, qui permettrait à chaque individu de trouver une nourriture complète, dans les conditions les plus exceptionnelles.

La vitamine C occupe désormais une place si considérable dans la Science de la nutrition qu'il peut paraître surprenant, à vrai dire, que son étude n'ait retenu l'attention des savants que depuis fort peu d'années.

Le facteur antiscorbutique est à la base de toute possibilité de vie, car il permet les fonctions les plus importantes de l'organisme vivant. Il provoque les phénomènes diastasiques qui règlent l'utilisation des principes immédiats biochimiques. Il a pour rôle, en outre, d'assurer chez l'animal la régularité de la respiration intracellulaire, et chez les végétaux de présider, semble-t-il, au phénomène de l'assimilation chlorophyllienne.

Etant donnée la facilité d'obtention de l'acide ascorbique naturel et de sa préparation par synthèse, il est permis de prévoir sa constante utilisation, dans un prochain avenir, pour combattre, dans l'éventualité d'une alimentation incomplète, les cas d'avitaminose partielle qui, bien qu'apparemment bénins peuvent, en se répétant, devenir chroniques. Des troubles de l'économie, dont nous n'avons pas encore élucidé l'origine, sont à même de se produire dans l'organisme.

C'est ainsi qu'il est fort possible que dans certains cas, par exemple pour des maladies telles que le diabète et le cancer, la cause en peut remonter à une carence agissant depuis plusieurs générations. Aussi, le but actuel des hygiénistes alimentaires devrait être de familiariser le public avec la possibilité de composer une alimentation bien équilibrée et d'envisager l'emploi des vitamines là où leur insuffisance paraîtrait caractérisée. On permettrait ainsi de réaliser un meilleur équilibre physico-chimique du sang et des humeurs en général, qui éviterait des transformations profondes dans l'organisme. En réglant judicieusement la relation entre les vitamines, facteurs de vie ou catalyseurs, et les aliments nécessaires à l'édification et au maintien de l'intégrité des tissus, on trouverait vraisemblablement la véritable solution au problème de l'alimentation.

L'homme civilisé, qui a trop tendance à s'écarter des conditions naturelles de vie, pourrait, en se tournant vers la Science, recueillir les notions indispensables à la conservation de sa santé et capables d'assurer à sa race la vigueur et la continuité.

BIBLIOGRAPHIE

- BACHARACH, COOK et SMITH. — Sur la teneur en acide ascorbique des fruits de divers *Citrus* et de quelques produits qui en dérivent. (*Biochemical Journal*, 1934, 28, p. 1038.)
- BESSEY et KING. — (*Journal of biological Chemistry*, 1933, 103, p. 687-698.)
- BEZSSONOFF. — Une condition complémentaire de l'épreuve au réactif de la vitamine C. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924.)
- Une méthode nouvelle pour caractériser l'action physiologique immédiate des vitamines hydrosolubles. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928.)
- Les effets physiologiques immédiats de l'avitaminose C. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928.)
- Deux remarques au sujet des réactions colorées des vitamines. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929.)
- Sur un nouveau régime scorbutigène nettement spécifique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927.)
- L'effet antiscorbutique est-il dû à deux substances différentes? (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927.)
- Sur les préparations antiscorbutiques isolées du chou et sur la détermination de leur valeur biologique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931.)
- La chimie de la vitamine C éclairée par la découverte de O. RYGH. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932.)
- Sur l'identification de la vitamine C. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934.)
- Sur l'identification et le dosage de la vitamine dans les milieux biologiques. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934.)

- BIRCH, HARRIS et RAY. — Microdosage chimique de l'acide hexuronique (vit. C) dans les aliments. (*Biochem. Journal*, 27, p. 590-594, 1933.)
- DALMER. — La vitamine C et autres substances chimiquement analogues (configuration et action antiscorbutique). (*D. Med. Woch.*, 1934, 10, 1200-1202.)
- DANN. — Sur le prétendu pouvoir antiscorbutique du mélange de méthyl-nornarcotine et d'acide glycuronique. (*Biochem. J.*, t. 27, p. 229-224, 1933.)
- DEMOLE. — Sur l'action physiologique de l'acide ascorbique et de quelques corps voisins. (*Biochem. J.*, 1934, 28, p. 770.)
- EMMERIC. — Séparation de la cystéine d'avec l'acide ascorbique par l'emploi d'acétate mercurique. (*Biochem. J.*, 1934, 28, 268-269.)
- GIROUD (A.) et LEBLOND (C.). — Recherches histochimiques sur la vitamine C dans l'organisme. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934.)
- GUHA et GHOSH. — Synthèse de l'acide ascorbique par les tissus *in vitro*. (*Nature*, 1934, 134, 739.)
- HARRISON. — L'action de la vitamine C sur l'oxydation des tissus *in vitro*. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 1501.)
- HAWORTH. — La constitution de l'acide ascorbique. (*Chem. Ind.*, 52, p. 482-485, 1933.)
- HIRST. — La structure de l'acide ascorbique. (*Chem. Ind.*, t. 52, p. 221-222, 1933.)
- L'acide ascorbique considéré comme facteur antiscorbutique. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 1271.)
- JOHNSON et ZILVA. — L'excrétion urinaire de l'acide ascorbique et déhydroascorbique chez l'homme. (*Biochem. J.*, 1934, 28, 1393-1408.)
- JOSLYN, MARSH et MORGAN. — Relation du pouvoir réducteur et de l'intensité du brunissement avec la teneur en vitamine C du jus d'orange exposé à l'air. (*J. of Biol. Chem.*, 1933.)

- KATZ. — Le dépistage du scorbut latent... (Thèse doctorat en médecine, 1933.)
- KERTESZ. — Une glucoréductone pour l'étalonnage des solutions de 2-6 dichlorophénolindophénol... (*J. biol. Chem.*, 1934, 104, 483-485.)
- MICHAUX (A.). — Recherches comparatives sur les humeurs et les organes du cobaye normal et du cobaye soumis à un régime scorbutigène. (Thèse doct. ès Sciences, Paris, 1929.)
- Le sodium et le potassium au cours du scorbut expérimental. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932.)
- MILLS. — La teneur en vitamine C du foie de mouton, avec observations sur les effets de la congélation et de la conservation. (*Biochem. J.*, 26, 704-711, 1932.)
- PHILLIPS et STARE. — La répartition d'une substance réductrice (vitamine C) dans le tissu des bœufs recevant du fluor. (*J. of Biochem. Chem.*, 1934, 104, 351-358.)
- PURR. — Influence de la vitamine C sur l'action des enzymes intracellulaires. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 1703.)
- L'influence de la vitamine C sur les amylases animales et végétales. (*Biochem. J.*, 1934, 28, 1144-1148.)
- RANDOIN. — La question des vitamines. II. Le facteur antiscorbutique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923.)
- RANDOIN et LECOCQ. — Le scorbut chronique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927.)
- RANDOIN et NETTER. — La nature chimique de la vitamine C ou des vitamines. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933.)
- RANDOIN et SIMONNET. — Les vitamines. (Collect. Armand Colin.)
- HARRIS et RAY. — Vitamine C et corticosurrénale. Pouvoir antiscorbutique de la surrénale de bœuf. (*Biochem. J.*, 26, 2067-2075, 1932.)
- La vitamine C et la corticosurrénale. Perte d'activité de la surrénale dans le scorbut. (*Biochem. J.*, 27, 303-310, 1933.)

- Spécificité de l'acide hexuronique comme facteur antiscorbutique. (*Biochem. J.*, 27, 580-589, 1933.)
 - La vitamine C dans la médullosurrénale. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 2006-2010.)
 - HARRIS, RAY et WARD. — L'excrétion de la vitamine C dans l'urine humaine et ses rapports avec le régime. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 2011-2015.)
 - HARRIS et RAY. — Etalonnage de l'activité antiscorbutique de l'acide ascorbique. (*Biochem. J.*, 1933, 27, 2016.)
 - Sur la présence de vitamine C dans l'embryon de poulet. (*Biochem. J.*, 1934, 28, 189-191.)
 - RAY. — Sur la nature du précurseur de la vitamine C dans le règne végétal. (*Biochem. J.*, 1934, 28, 996-1003.)
 - SVIRBELY et GYÖRGYI (Szent). — Sur la nature chimique de la vitamine C. (*Biochem. J.*, 27, 279-285, 1933.)
 - SVIRBELY. — Teneur du foie et des surrénales de divers animaux en acide ascorbique. (*Biochem. J.*, 27, 960-963, 1933.)
 - SZENT GYÖRGYI. — L'acide ascorbique (vitamine C). (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933.)
 - ZILVA et CRANE. — Le pouvoir antiscorbutique des pommes. (*Biochem. J.*, 26, 2177-2181, 1932.)
 - ZILVA. — Le pouvoir antiscorbutique de la corticosurrénale de bœuf. (*Biochem. J.*, 26, 2182, 1932.)
 - L'oxydation enzymatique réversible de la vitamine C. (*Biochem. J.*, 28, 663-666, 1934.)
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	7

PREMIÈRE PARTIE

LE SCORBUT

CHAPITRE PREMIER. — <i>Historique</i>	15
CHAPITRE II. — <i>L'étude du scorbut</i>	17
a) Chez l'adulte	17
b) Chez l'enfant	20
CHAPITRE III. — <i>Le scorbut expérimental</i>	22
a) Les régimes scorbutigènes	22
b) Le scorbut expérimental	26

DEUXIÈME PARTIE

AUTOUR DU PROBLÈME DE LA VITAMINE C

CHAPITRE PREMIER. — <i>Essais d'extraction</i>	37
CHAPITRE II. — <i>La dualité de la vitamine C</i>	40
CHAPITRE III. — <i>La vitamine C et les recherches de O. Rygh</i>	45

TROISIÈME PARTIE

CARACTÉRISATION DE LA VITAMINE C

(Acide ascorbique)

CHAPITRE PREMIER. — <i>Travaux de Szent Györgyi</i>	55
a) L'oxydation et la réduction de l'acide hexurorique	59
b) Le potentiel oxydo-réducteur de l'acide hexurorique	60
CHAPITRE II. — <i>Identification de la vitamine C</i>	62
a) Les propriétés antiscorbutiques de l'acide hexurorique. Théories sur l'indentité de la vitamine C et du principe réducteur.....	62
b) Spécificité de l'acide hexurorique comme facteur antiscorbutique	65
CHAPITRE III. — <i>Les propriétés physiques et chimiques et la constitution de l'acide ascorbique</i>	71
CHAPITRE IV. — <i>Action de divers agents physiques et chimiques sur le pouvoir antiscorbutique</i>	75
CHAPITRE V. — <i>Extraction de l'acide ascorbique</i>	84

QUATRIÈME PARTIE

LE DOSAGE DE LA VITAMINE C

CHAPITRE PREMIER. — <i>Méthodes de dosage de la vitamine C</i>	91
a) Méthodes biologiques	91
b) Méthode physique	98
c) Méthodes physico-chimiques et chimiques...	99
CHAPITRE II. — <i>Etalonnage de la vitamine C</i>	114

CINQUIÈME PARTIE

LA VITAMINE C CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

CHAPITRE PREMIER. — <i>Principales sources de vitamine C</i>	121
CHAPITRE II. — <i>La vitamine C chez les végétaux</i> ...	123
CHAPITRE III. — <i>La vitamine C chez les animaux</i> ...	127
CHAPITRE IV. — <i>Caractères divers</i>	139
<i>a) Caractères de l'élimination de l'acide ascorbique par l'urine</i>	139
<i>b) Diagnostic du scorbut latent chez le nourrisson</i>	140
CHAPITRE V. — <i>Synthèse de la vitamine C chez les végétaux</i>	142
CHAPITRE VI. — <i>Synthèse de la vitamine C chez les animaux</i>	145

SIXIÈME PARTIE

ACTION BIOLOGIQUE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Rôle de la vitamine C chez les végétaux</i>	153
CHAPITRE II. — <i>Rôle de la vitamine C chez les animaux</i>	159
CHAPITRE III. — <i>L'influence de la vitamine C sur les enzymes intracellulaires</i>	166
CONCLUSION	168
BIBLIOGRAPHIE	171

VU :

Nancy, le 14 Mai 1935.
Le Président de Thèse,
PASTUREAU.

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 15 Mai 1935.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
GILLOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Nancy, le 16 Mai 1935.
Le Recteur de l'Académie,
BRUNTZ,
Président du Conseil de l'Université.





